Service Commun de Microscopie

MANUEL D'UTILISATION - Précis

Microscope Confocal Zeiss LSM 510

Version 1 – Précis
Août 2014

SERVICE COMMUN DE MICROSCOPIE

MANUEL D'UTILISATION

Microscope Confocal Zeiss LSM 510

Version 1 – Précis
Août 2014

Sommaire

PRESENTATION DU MICROSCOPE 1

PRESENTATION DU SOFTWARE 3

DESCRIPTION DES ICONES ET FENETRES : 4
Icône principale « File » 4
Icones secondaires correspondantes : 4
Icône principale « Acquire » 4
Icones secondaires et fenêtre de fonctions correspondantes : 4
Icône principale « 3D View » 7
Icone secondaire correspondante : 7
ORGANISATION DE L'ESPACE DE TRAVAIL 8

DEMARRAGE DU MICROSCOPE 9

LA GESTION DES DONNEES 11

PENDANT LA SESSION 11
EN FIN DE SESSION 11

DEROULEMENT D'UNE SESSION 13

DEMARRAGE DU LOGICIEL 13
INITIATION PILOTAGE/MANIPULATION DU MICROSCOPE 15
Ce que vous pouvez faire dans le logiciel 15
Ce que vous pouvez faire sur le microscope 16
INSTALLATION DE L'ECHANTILLON 18
Etape facultative (10) – Mise en place du Porte-Objet 21
REALISATION DE LA MISE AU POINT 26
Pour faire la mise au point en fluorescence : 26
Pour faire la mise au point en lumière blanche : 27
REALISATION DE LA CONFIGURATION CONFOCALE 28
Description de l'exemple 28
Connaître ses fluorochromes 28
Configuration du trajet optique en mode confocal 30
Allumage des LASERS 30
Les types de configurations : Single vs Multi-Tracks 32
Pour réaliser la suite de votre configuration : 33
La fenêtre « Configuration control » 33
Configuration de la Track 1 : « Alexa 488 + To Pro 3 » 35
Type de filtres 38
Configuration de la Track 2 : « TRITC » 40
Résumé de la configuration de démo 43
Réalisation d'une acquisition en transmission en mode confocal 44
Enregistrement et rappel de configuration 45
Enregistrement de configuration 45
Rappel de configuration 45
REGLAGE DES PARAMETRES D'ACQUISITION 47
La fenêtre « Scan Control » 48
ACQUISITION ET ENREGISTREMENT D'IMAGES 62
Acquisition d'images simples (uniquement le plan focal) 62
Acquisition de Z-stacks (piles d'images en z) 64
Enregistrement des images 66
Création et ouverture d'une base de données 66
Enregistrement de l'image 69
EXPLORER SES IMAGES 72

Introduction 72
Les icônes « Images » 72
CHANGER D'OBJECTIF AU COURS DE LA SESSION 74
Passage d'un objectif sec à un autre objectif sec 74
Passage d'un objectif sec à un objectif à immersion 74
Passage d'un objectif à immersion à un objectif sec 75
Passage d'un objectif à immersion à un autre objectif à immersion 76
CHANGER DE LAME AU COURS DE LA SESSION 77
Si vous êtes sur un objectif sec 77
Si vous êtes sur un objectif à immersion 77
RAPPEL DES PARAMETRES D'ACQUISITION D'UNE IMAGE 79

FIN DE SESSION 80

ETAPES INITIALES 80
PROCEDURE DE FIN N°1 – SANS ARRET DE L'EQUIPEMENT 82
PROCEDURE DE FIN N°2 – ARRET COMPLET DE L'EQUIPEMENT 83

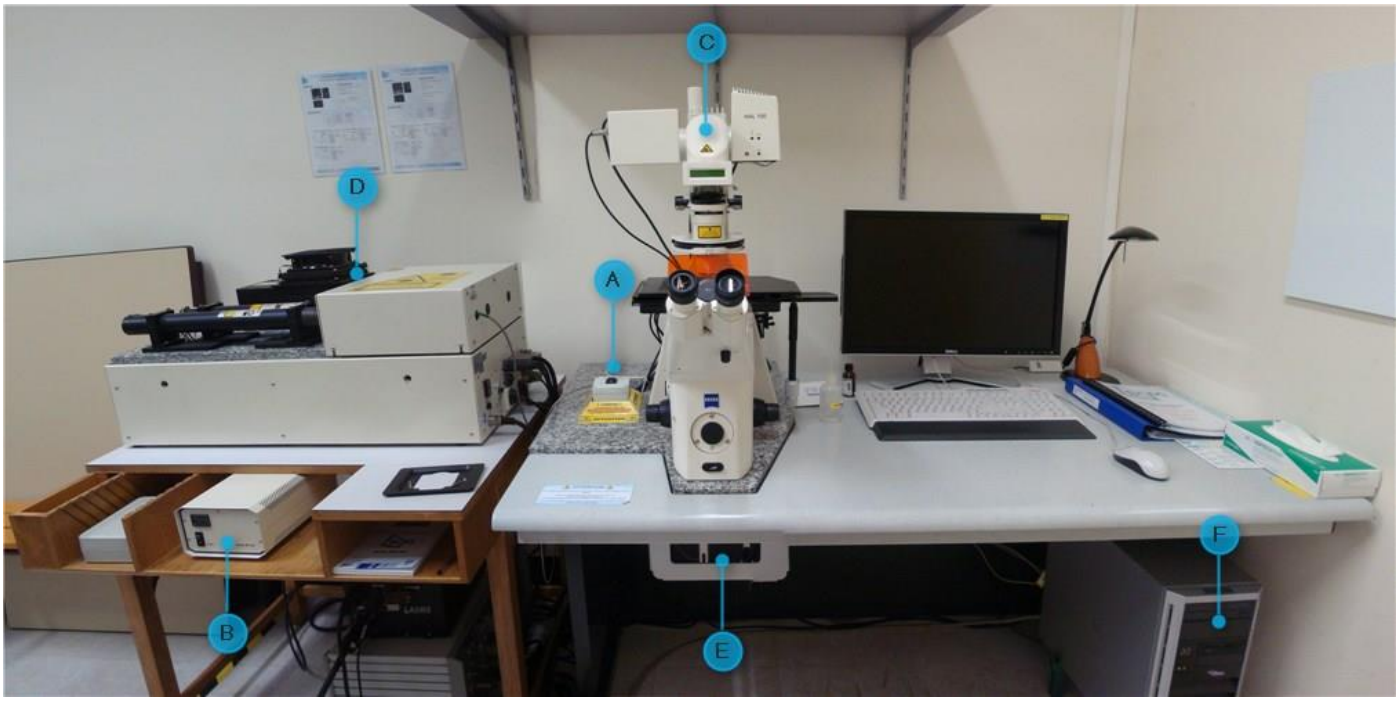
PROCEDURES EN CAS D'INCIDENT 90

PROCEDURE URGENCE TECHNIQUE – EN CAS D'ABSENCE DU RESPONSABLE DE LA PLATE-FORME 90
En cas de problème dans une pièce 90
Si vous entendez ou voyez de l'eau couler du plafond 91
PROCEDURE EN CAS D'INCIDENT EQUIPEMENT 92
En cas d'absence du Responsable de la Plate-Forme : 92
Si vous ne trouvez personne pour résoudre le problème : 92

TABLE DES ILLUSTRATIONS 93

COPIES D'ECRAN 93
PHOTOS 94
SCHEMAS 95
TABLEAUX 95

Présentation du microscope



Photo(s) 1 : Vue d'ensemble du microscope confocal Zeiss LSM 510

Légende :

A- Remote Control – Alimentation générale
B- Alimentation lampe fluo (HBO)
C- Statif du microscope
D- Banc Lasers
E- Tête confocale
F- Ordinateur

Le microscope confocal Zeiss LSM 510 est monté sur un statif d'épifluorescence inversé Axiovert 200 M *(voir Photo(s) 1 ci-dessus – C).*

Ce statif est composé :

- ⇨ De 2 sources de lumière :
  - ↳ 1 source halogène pour l'observation de l'échantillon en transmission.
  - ↳ 1 source à vapeur de mercure (lampe HBO) pour l'excitation et l'observation des fluorochromes *(voir Photo(s) 1 ci-dessus – B)*.
- ⇨ D'un trajet optique comprenant différentes lentilles, des miroirs, des filtres et des objectifs pour guider la lumière jusqu'à l'échantillon puis jusqu'aux yeux de l'observateur.
  Les objectifs présents sur ce microscope sont les suivants :
  - ↳ 1 objectif 2,5x / sec / O.N. = 0,12
  - ↳ 1 objectif 10x / sec / O.N. = 0.30
  - ↳ 1 objectif 20 x / sec / O.N. = 0,5
  - ↳ 1 objectif 40x / immersion huile / O.N. = 1,3
  - ↳ 1 objectif 63x / immersion huile / O.N. = 1,4
- ⇨ Ce microscope n'est pas équipé de caméra CCD puisqu'il n'est pas destiné à faire des acquisitions en épifluorescence classique.

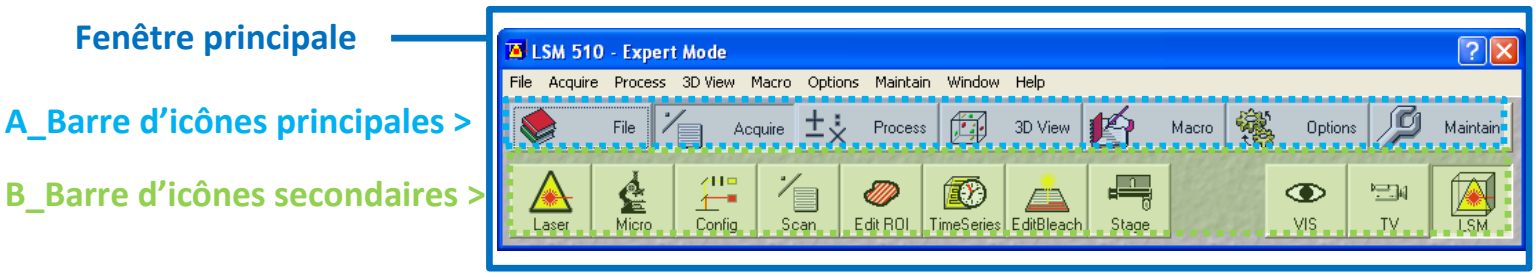
Pour transformer ce statif en microscope confocal il a fallu rajouter :

- ⇨ 1 banc lasers *(voir Photo(s) 1 p.1 – D)* comprenant les raies suivantes :
  - ↳ 1 Argon multiraies 458 / 477 / 488 / 514 nm de 30 mW
  - ↳ 1 Hélium-Néon 543 nm de 1,0 mW
  - ↳ 1 Hélium-Néon 633 nm de 5,0 mW
- ⇨ 1 tête confocale *(voir Photo(s) 1 p.1 – E)* comprenant :
  - ↳ Un scanner X/Y.
  - ↳ Des photomultiplicateurs pour la détection du signal.
    2 photomultiplicateurs (PMT-Fluo) sont disponibles pour l'observation des fluorochromes.
    1 photomultiplicateur (PMT-Trans) est disponible pour l'observation de la lumière transmise.

Présentation du software

Le logiciel LSM 510 de Zeiss pilote ce microscope.

De nombreuses opérations de contrôles du microscope pourront se faire directement dans le logiciel.


Fenêtre principale
A_Barre d'icônes principales >
B_Barre d'icônes secondaires >
LSM 510 - Expert Mode
File Acquire Process 3D View Macro Options Maintain Window Help
File Acquire Process 3D View Macro Options Maintain
Laser Micro Config Scan Edit ROI TimeSeries EditBleach Stage VIS TV LSM

Copie d'écran 1 : Fenêtre principale du logiciel

Chaque icône principale appelle une barre d'icônes secondaire particulière.

Vous trouverez ci-dessous les 3 icônes principales que nous allons utiliser avec les icônes secondaires correspondantes :

Icônes principales	Icônes secondaires correspondantes
File	New, Open, Save, Save As, Import, Export, Multi Print, Exit
Acquire	Laser, Micro, Config, Scan, Edit ROI, TimeSeries, EditBleach, Stage, VIS, TV, LSM
3D View	DepthCod, Projection, Stereo, DCV

Tableau 1 : Icônes principales et secondaires

Chaque icône secondaire vous permettra d'appeler des fonctions ou d'ouvrir des fenêtres regroupant un ensemble de fonctions.

Retenez que pour naviguer dans le logiciel LSM 510, tout part de la fenêtre principale. Sélectionnez donc tout d'abord une icône principale. Cette dernière appellera les icônes secondaires correspondantes (dans la fenêtre principale).

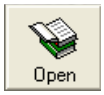
Cliquez ensuite sur l'icône secondaire de votre choix pour appeler une fonction ou une fenêtre de fonctions (les fenêtres de fonctions sont des fenêtres volantes qui s'ouvrent toujours en dehors de la fenêtre principale).

Description des icônes et fenêtres :

Icône principale « File »

Icones secondaires correspondantes :

1.

> Permet de créer une nouvelle base de données pour enregistrer ses images.
2. 

> Permet d'ouvrir une ancienne base de données.
3.

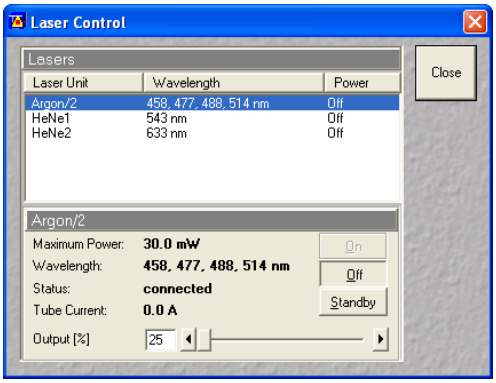
> Permet de sauvegarder une image (d'autres techniques permettent d'enregistrer vos images).

Icône principale « Acquire »

Icones secondaires et fenêtre de fonctions correspondantes :

1.

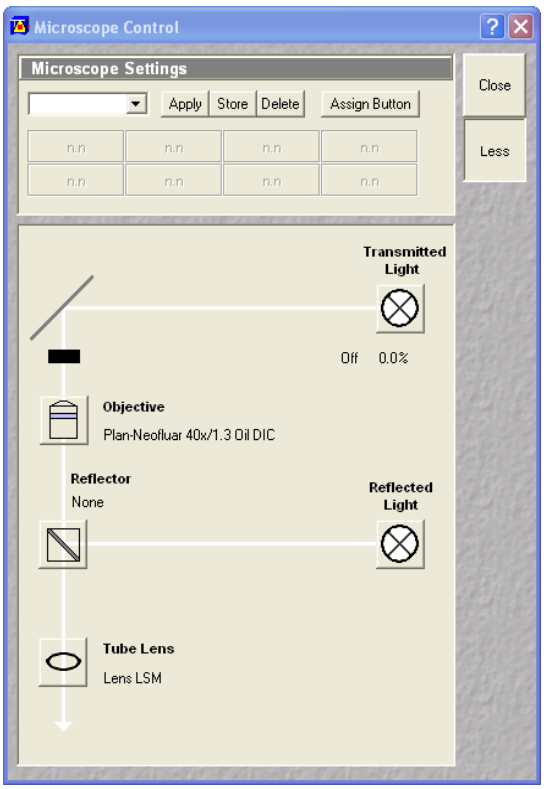
> Permet d'ouvrir la fenêtre « Laser Control » pour la gestion des lasers



Copie d'écran 2 : Fenêtre « Laser Control »

2.

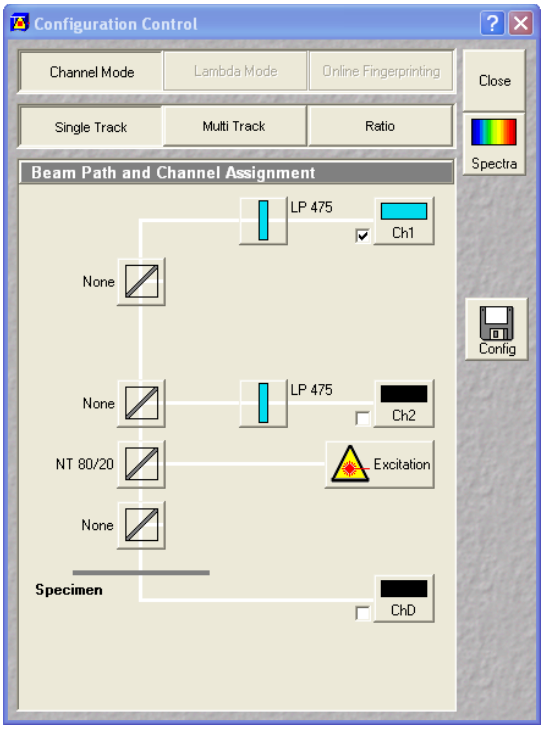
> Permet d'ouvrir la fenêtre « Microscope control » pour piloter le microscope en mode épifluorescence » (Représente le trajet optique du microscope en mode épifluorescence).



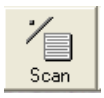
Copie d'écran 3 : Fenêtre « Microscope Control »

3.

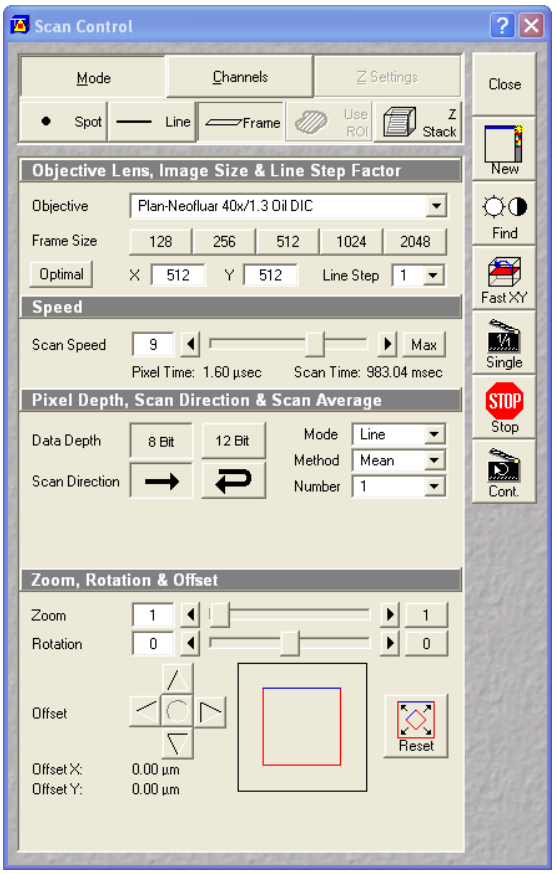
> Permet d'ouvrir la fenêtre « Configuration control » pour définir le trajet optique du microscope en mode confocal (Représente le trajet optique du microscope en mode confocal).



Copie d'écran 4 : Fenêtre « Configuration control »

4. 

> Permet d'ouvrir la fenêtre « Scan control » pour définir les paramètres d'acquisition confocale.



Copie d'écran 5 : Fenêtre « Scan control »

5.

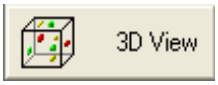
> Permet de déverrouiller le mode épifluorescence. En mode « VIS » (**VIS**ible) vous pouvez visualiser votre échantillon par l'intermédiaire des oculaires.

△ ***Attention :***

Pensez à bien activer le mode « VIS » avant de travailler en mode épifluorescence classique. Dans le cas contraire vous ne pourrez rien voir dans les oculaires.

6.

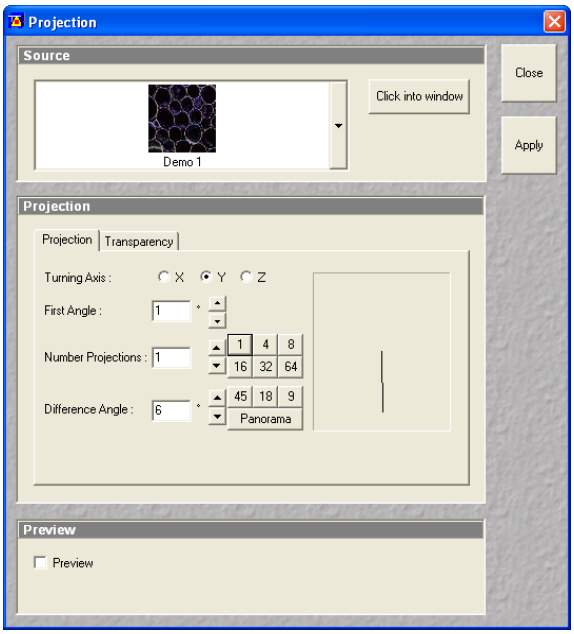
> Permet de faire les acquisitions en mode confocal. Le logiciel passe automatiquement en mode « LSM » quand vous lancez l'acquisition d'une nouvelle image confocale.

Icône principale « 3D View » 

Icone secondaire correspondante :

1.

> Permet de faire des projections à partir d'acquisition de stacks.



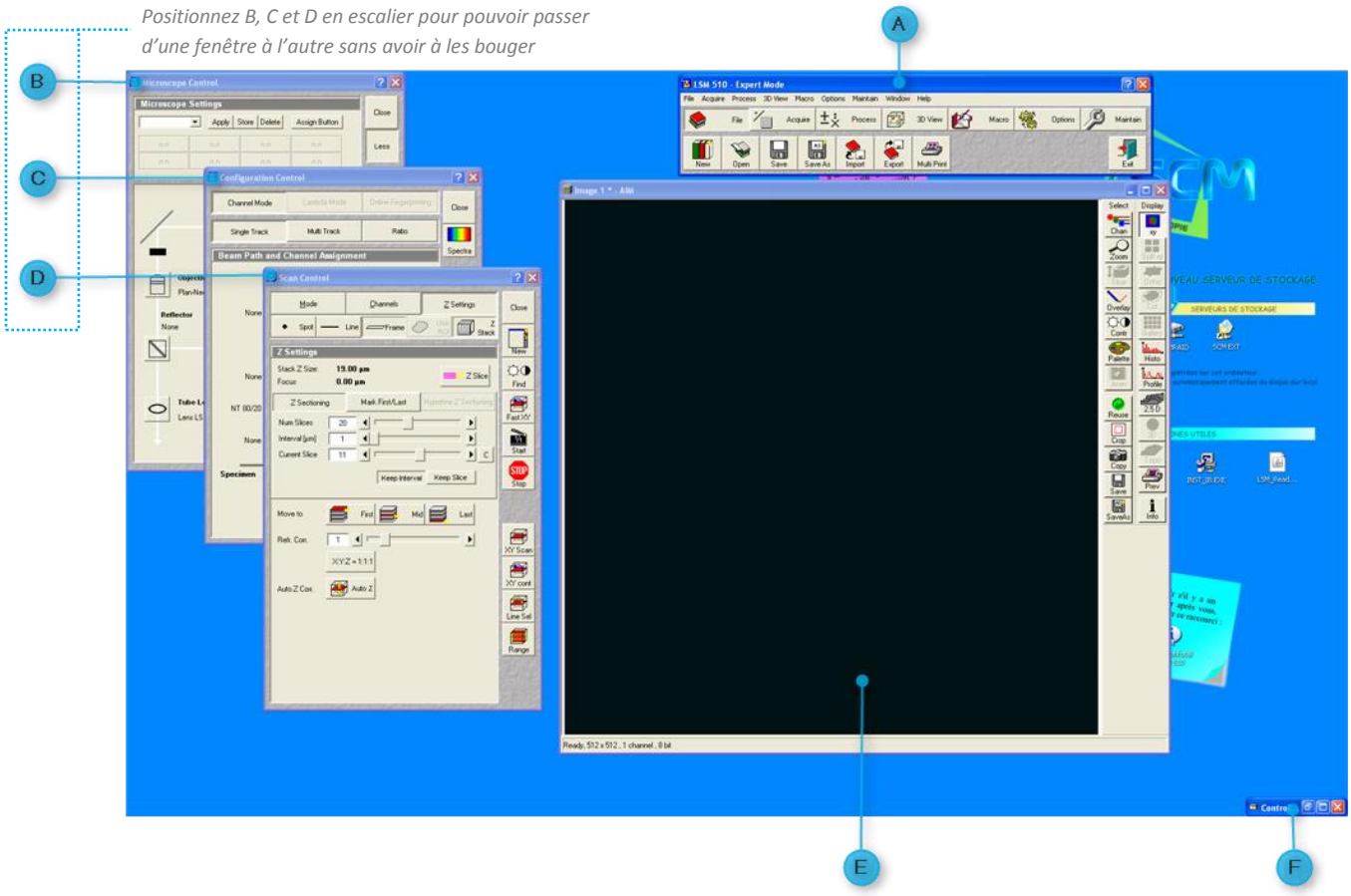
Copie d'écran 6 : Fenêtre « Projection »

Organisation de l'espace de travail

Le logiciel LSM 510 s'articule autour de nombreuses fenêtres volantes. Il convient donc de gérer efficacement l'espace de travail pour ne pas rapidement envahir le bureau de l'ordinateur.

Pour gagner en efficacité, n'ouvrez que les fenêtres dont vous avez besoin. Laissez ouverte les fenêtres que vous utilisez régulièrement mais fermez celles que vous utilisez occasionnellement pour libérer au maximum l'espace.

Vous trouverez ci-dessous un exemple d'organisation de l'espace qui vous permet d'accéder à l'ensemble des fonctions indispensables et de pouvoir passer facilement d'une fenêtre à l'autre sans avoir besoin de les bouger.



Copie d'écran 7 : Organisation espace de travail

Légende :

- *A- Fenêtre principale - Voir Présentation du software - p.3*
- *B- Fenêtre « Microscope Control » - Voir Copie d'écran 3 : Fenêtre « Microscope Control » - p.5*
- *C- Fenêtre « Configuration Control » - Voir Copie d'écran 4 : Fenêtre « Configuration control » - p.5*
- *D- Fenêtre « Scan Control » - Voir Copie d'écran 5 : Fenêtre « Scan control » - p.6*
- *E- Fenêtre d'affichage des images acquises ou en cours d'acquisition*
- *F- Fenêtre de la base de données*

Démarrage du microscope

Photo(s) 2 : Etape de démarrage du microscope

<u>Les numéros indiqués sur la photo ci-dessus correspondent aux numéros de la liste qui suit (1 à 4).</u>

Avant toute chose, retirez la housse de protection présente sur le banc lasers et celle du statif.

Pour démarrer le microscope :

1. Mettez le « Remote Control » sur On (I).

Photo(s) 3 : Remote Control

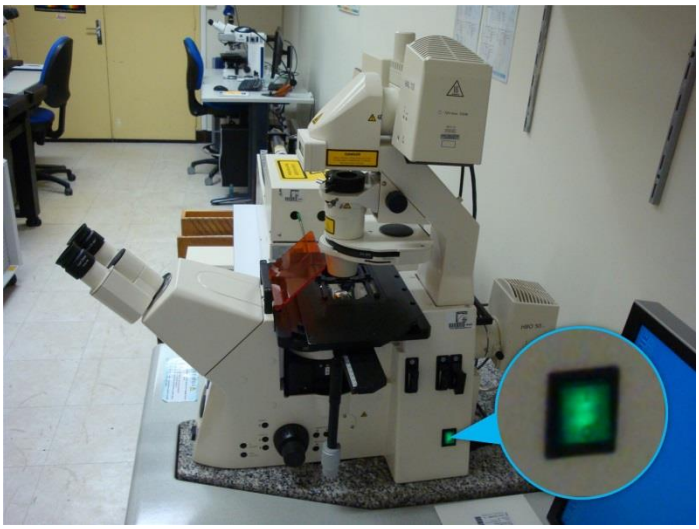
2. Mettez l'alimentation de la lampe fluo (HBO) sur On (led verte).

Photo(s) 4 : Alimentation lampe HBO

△ ***Attention :***

Une fois la lampe HBO allumée, ne pas l'éteindre avant 20 minutes.
De même, il faut attendre au moins 20 minutes avant de pouvoir rallumer la lampe HBO.

3. Vérifiez que le statif est bien allumé (Interrupteur vert sur la droite du microscope).
   Si le statif est éteint, allumez-le à ce moment-là.



Photo(s) 5 : Alimentation statif

4. Allumez l'ordinateur.
5. Allumez l'écran s'il n'était pas en veille.
6. Attendez que l'écran affiche le message suivant : « Press CTRL + ALT + DELETE to log on ».
7. Appuyez sur les touches « CTRL + ALT + DELETE » pour ouvrir une fenêtre d'authentification.
8. Entrez le nom d'utilisateur et le mot de passe qui vous ont été fournis pendant la formation et appuyez sur « Enter ».

△ ***Attention :***

Le clavier de cet ordinateur est un clavier anglais « QWERTY ».

9. Attendez que la session s'initialise.

L'étape de démarrage du microscope est maintenant terminée. Si vous avez le moindre doute ou si vous rencontrez une difficulté rapprochez-vous immédiatement du Responsable de la Plate-Forme.

La gestion des données

Une gestion des données efficace est primordiale pour permettre aux utilisateurs de pouvoir utiliser les équipements dans de bonnes conditions. En effet, une mauvaise gestion des données entrainerait une saturation des disques durs et diminuerait considérablement les performances de l'ordinateur de pilotage.

Pendant la session

Pendant la session, enregistrez vos images dans **VOTRE** dossier personnel sur le disque dur local de l'ordinateur à l'adresse indiquée sur l'étiquette jaune collée en haut à droite de l'écran > F : (Images LSM 510).

Un raccourci nommé « Stockage Local » est disponible sur le bureau de l'ordinateur.

Vous pouvez aussi rejoindre le stockage local en cliquant sur le chemin suivant : « Logo Démarrer »

(en bas à gauche de l'écran) > « Poste de travail » > « Disque dur correspondant au stockage local ».

△ ***Attention :***

Les images sont conservées 6 mois sur les disques durs locaux puis sont **SUPPRIMEES AUTOMATIQUEMENT.**
Les images qui ne sont pas enregistrées à l'adresse indiquée par l'étiquette jaune (en haut à droite de l'écran) sont **SUPPRIMEES AUTOMATIQUEMENT.**

En fin de session

Transférez vos images dans **VOTRE** dossier personnel sur le serveur de stockage du SCM. Pour accéder au serveur de stockage, double-cliquez sur le raccourci « SCMRAID » présent sur le bureau de l'ordinateur.

Pour transférer vos images faites simplement un copier/coller de votre « dossier local » à votre « dossier serveur ».

△ ***Attention :***

Les images sont conservées 900 jours sur le serveur de stockage puis sont **SUPPRIMEES AUTOMATIQUEMENT.**
Veillez à bien à transférer vos images dans votre « dossier personnel serveur ».

Une fois de retour dans votre laboratoire, accédez au serveur de stockage SCMRAID puis transférez vos images sur votre ordinateur personnel. Vous pouvez maintenant explorer ou traiter vos images depuis votre ordinateur.

⊗

A NE PAS FAIRE :

NE BRANCHEZ JAMAIS DE PERIPHERIQUE SUR LES ORDINATEURS DU SCM (Pas de clé USB, Disques durs externes…).

Pour ne pas ralentir ou bloquer le serveur :
N'ENREGISTREZ **JAMAIS** VOS IMAGES DIRECTEMENT SUR LE SERVEUR
N'OUVREZ **JAMAIS** VOS IMAGES A PARTIR DU SERVEUR.
N'ANALYSEZ **JAMAIS** VOS IMAGES A PARTIR DU SERVEUR.

Déroulement d'une session

Démarrage du logiciel

1. Lancez le logiciel de pilotage en double cliquant sur l'icône « LSM 510 »

(en haut à gauche du bureau de l'ordinateur).

   La fenêtre suivante s'ouvre :

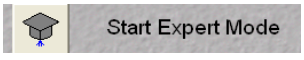
Copie d'écran 8 : Fenêtre d'ouverture du logiciel LSM 510

   Puis le panneau de démarrage (« Switchboard ») s'ouvre :

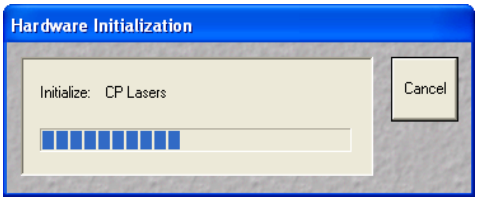
Copie d'écran 9 : Panneau « Switchboard » - Démarrage du logiciel LSM 510

2. Sur le panneau de démarrage :

   ↳ Cliquez sur « Scan New Images »

   ↳ Cliquez ensuite sur « Start Expert Mode » 

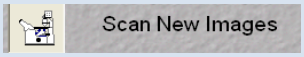
La fenêtre d'initialisation s'ouvre et les composants du microscope se connectent au logiciel (vous devriez entendre de petits bruits au niveau du statif qui vous indiquent que tout se déroulement correctement).

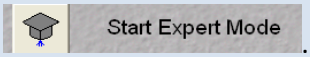


Copie d'écran 10 : Fenêtre d'initialisation du logiciel

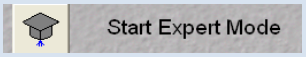
A savoir / Notez-bien :

Vous pouvez être confronté aux situations suivantes :

- Si l'initialisation du logiciel se déroule sans aucun bruit au niveau du statif, c'est que vous démarrez le logiciel en mode « Use Existing Images ».
  Dans ce cas :
  - ↳ Une fois le logiciel ouvert, fermez la fenêtre principale* en cliquant sur la croix. Sur le panneau de démarrage**, cliquez-bien sur « Scan New Images » 

  et sur « Start Expert Mode » 

  .

- Si quand vous cliquez sur « Start Expert Mode » 

vous avez une fenêtre avec de nombreux messages d'erreurs qui s'ouvre en bas à gauche de l'écran, c'est que vous démarrez le logiciel avec le statif éteint.
  Dans ce cas :
  - ↳ Fermez la fenêtre principale* en cliquant sur la croix.
  - ↳ Fermez les messages d'erreurs et le panneau de démarrage** en cliquant sur la croix.
  - ↳ Allumez le statif***.
  - ↳ Suivez à nouveau les étapes de démarrage du microscope à partir de l'étape 1 (Voir page 9).

- Pendant la session, si le logiciel ne répond plus ou que vous avez le message suivant « Hardware is busy » c'est qu'un élément du microscope de communique plus correctement avec le logiciel.
  Dans ce cas :
  - ↳ Fermez la fenêtre principale en cliquant sur la croix.
  - ↳ Fermez panneau de démarrage** en cliquant sur la croix.
  - ↳ Coupez le statif*** (Attention : NE COUPEZ QUE LE STATIF ET RIEN D'AUTRES – NE COUPEZ SURTOUT PAS LE REMOTE CONTROL).
  - ↳ Rallumez le statif***.
  - ↳ Suivez à nouveau les étapes de démarrage du logiciel à partir de l'étape 1 (Voir page 13).

* *Voir Présentation du software – p.3*
** *Voir Copie d'écran 9 : Panneau « Switchboard » - Démarrage du logiciel LSM 510 – p.13*
*** *Voir Démarrage du microscope – p.9 – Etape 3*

Initiation pilotage/manipulation du microscope

Il existe 2 façons de piloter et manipuler le microscope :

- ↳ Depuis le logiciel dans la fenêtre « Microscope Control »[*].
- ↳ Directement sur le statif.

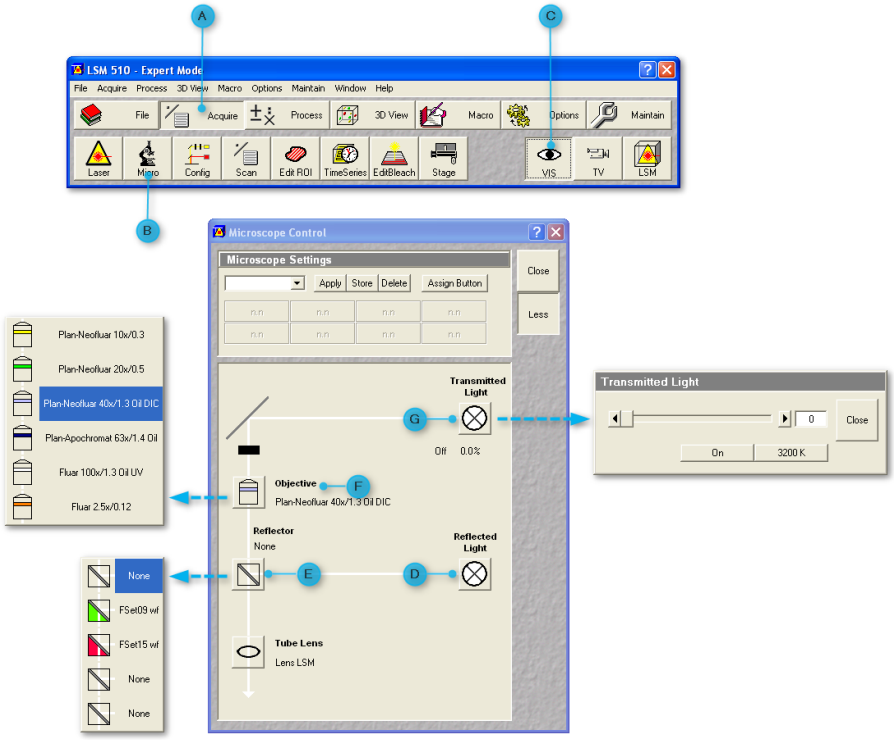
Ce que vous pouvez faire dans le logiciel

Pour accéder aux fonctions de pilotage, vous devez être sur la fenêtre « Microscope Control »[*]

avec l'icône « VIS »[**] activée

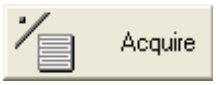
. Vous pourrez alors :

- ⇨ Ouvrir/Fermer le shutter de la lampe fluo : Cliquez sur l'icône **D**[***].
- ⇨ Choisir votre cube de fluorescence (Vert ou Rouge) : Cliquez sur l'icône **E**[***] puis choisissez le cube voulu.
- ⇨ Choisir votre objectif (2,5x sec, 10x sec, 20x sec, 40x huile, 63x huile) : Cliquez sur l'icône **F**[***] puis cliquez sur l'objectif voulu.
- ⇨ Allumer/Eteindre la lampe halogène : cliquez sur l'icône **G**[***] puis cliquez sur « on » pour allumer. Recliquez sur « On » pour éteindre. Vous pouvez aussi ajuster l'intensité de la lampe en jouant sur le curseur.



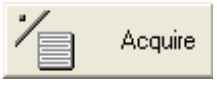
Copie d'écran 11 : Fenêtre "Microscope Control" 2

---

[*] *Voir Icône principale « Acquire »* 

- p. 4 - n°2

ou Copie d'écran 11 : Fenêtre "Microscope Control" 2 – p. 15 – Point A et B

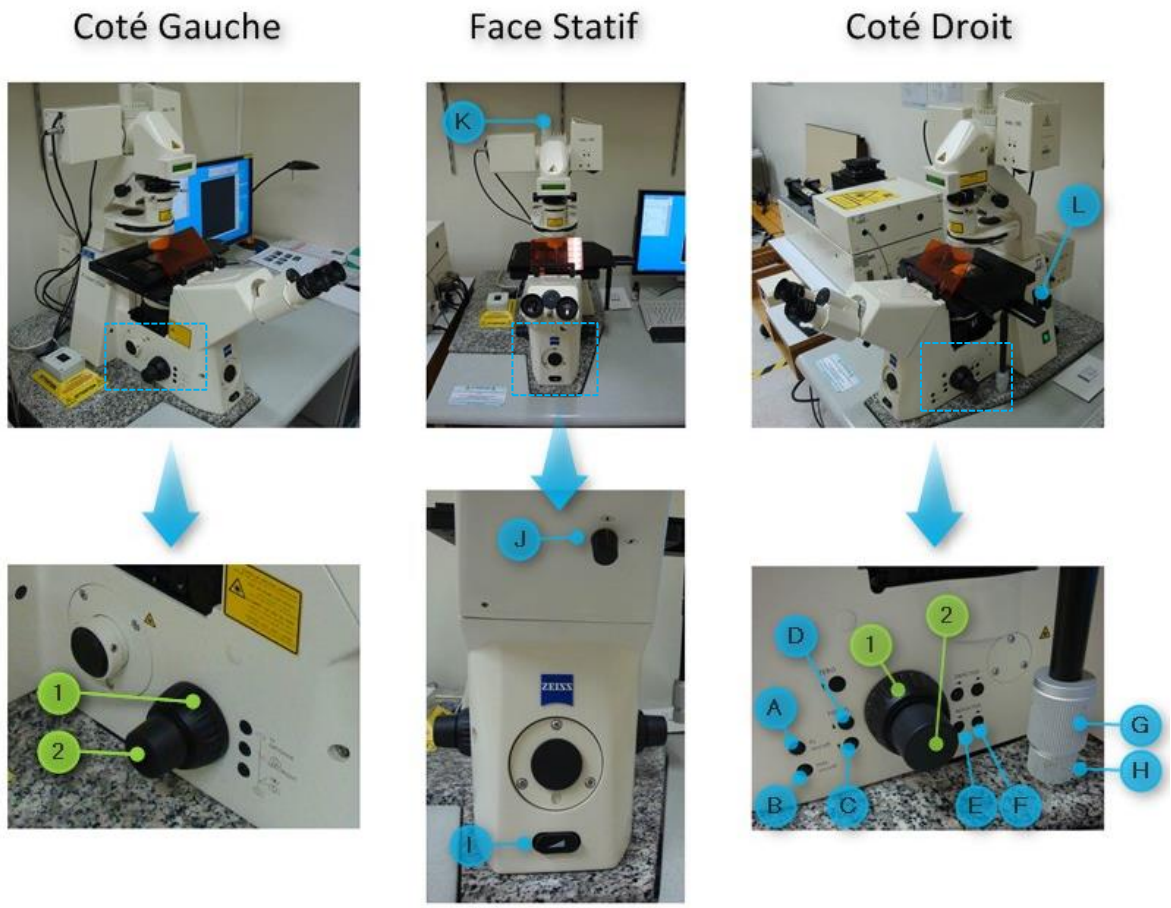
[**] *Voir Icône principale « Acquire »* 

- p. 4 - n°5

ou Copie d'écran 11 : Fenêtre "Microscope Control" 2 – p. 15 – Point C

[***] *Voir Copie d'écran 11 : Fenêtre "Microscope Control" 2 – p.15*

Ce que vous pouvez faire sur le microscope



Photo(s) 6 : Vues statif

Légende :

- *A- Ouverture/Fermeture shutter lampe fluo*
- *B- Allumage/Extinction lumière transmise*
- *C- Descente de la tourelle d'objectifs*
- *D- Retour des objectifs à la dernière position de focus*
- *E- Changement de cube de fluorescence (tourne dans le sens 1)*
- *F- Changement de cube de fluorescence (tourne dans le sens 2)*
- *G- Joystick X/Y – Déplacement de la platine en X*
- *H- Joystick X/Y – Déplacement de la platine en Y*
- *I- Réglage intensité lumière transmise*
- *J- Mise en place ou retrait du cache au niveau des oculaires*
- *K- Poignée pour basculer la tête du statif*
- *L- Endroit des diaphragmes d'ouverture (A) et de champ (F) pour la fluo*

1. *Vis macrométrique*
2. *Vis micrométrique*

Pour les vis de mise au point :

- *Les objectifs descendent quand on tourne la vis vers soi*
- *Les objectifs montent quand on tourne la vis vers le mur*

Le statif est équipé de vis macro et micrométriques. Ces vis de réglage de la mise au point sont disponibles à gauche et à droite du statif.

⊗ ***ATTENTION / A NE PAS FAIRE :***

Lors du réglage de la mise au point avec les vis macro et micrométriques, utilisez les vis de gauches **OU** les vis de droites mais **JAMAIS LES 2 COTES EN MEME TEMPS.**

Sur le côté droit du statif, vous trouverez une série de touches de raccourcis pour vous permettre de piloter le microscope.

- Touche **A*** : Permet d'ouvrir ou fermer le shutter de la lampe fluo.
- Touche **B*** : Permet d'allumer et d'éteindre la lampe halogène.
- Touche **C* = « Focus Bas »** : En appuyant sur cette touche vous descendez rapidement les objectifs en position basse.
- Touche **D* = « Focus Haut»** **:** En appuyant sur cette touche vous retournez automatiquement à la dernière mise au point qui a été effectuée sur le microscope.
- Touche **E*** : Permet de changer les cubes de fluorescence (tourne dans le sens 1).
- Touche **F*** : Permet de changer les cubes de fluorescence (tourne dans le sens 2).
- Molette **G*** : Permet de déplacer la platine en X.
- Molette **H*** : Permet de déplacer la platine en Y.
- Touche **I*** : Permet de régler l'intensité de la lampe halogène.

⊗ ***ATTENTION :***

Avant de regarder dans les oculaires, assurez-vous que l'intensité de la lampe halogène ne soit pas trop élevée.

- Molette **J*** : Permet de mettre en place ou de retirer le cache au niveau des oculaires.
- Poignée **K*** : Permet de basculer ou de remettre la tête du statif.

⊗ ***ATTENTION :***

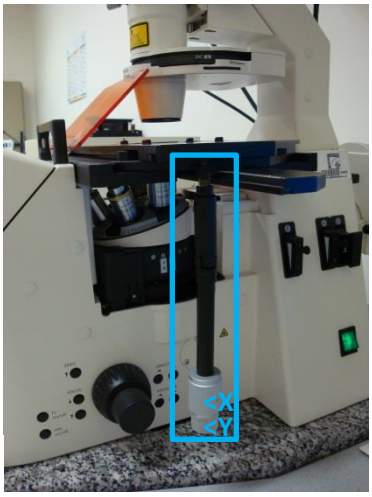
N'utilisez que la poignée **K*** pour manipuler la tête du statif. **N'UTILISEZ RIEN D'AUTRE**.

- Diaphragme **L*** : Le diaphragme d'ouverture (noté A sur le statif) vous permet d'ajuster l'intensité de la fluorescence perçue au niveau des oculaires.

Le déplacement en x/y

Le déplacement en x et y de la platine s'effectue avec le joystick x/y manuel attaché directement à la platine.

La molette du haut vous permet de déplacer le platine en X et celle du bas en Y.



Photo(s) 7 : Joystick

⊗ ***ATTENTION :***

Quand vous déplacez la platine, veuillez à ce que la platine ne touche JAMAIS les objectifs.

* *Voir Photo(s) 6 : Vues statif – p. 16*

Installation de l'échantillon

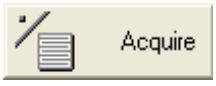
Avant de sortir vos échantillons, allumez une ou des lampes de bureau et éteignez l'éclairage principal de la pièce. Chaque lampe de bureau est équipée d'un variateur d'intensité. Utilisez le variateur pour ajuster la luminosité en fonction de vos besoins.

Photo(s) 8 : Variateur lumière

⊗ ***ATTENTION / A NE PAS FAIRE :***

N'utilisez pas le variateur pour allumer/éteindre la lampe. Utilisez l'interrupteur de la lampe de bureau.

Pour installer votre échantillon, suivez les étapes indiquées ci-dessous :

1. Dans la fenêtre principale, cliquez sur l'icône principale « Acquire »* 

2. Cliquez sur l'icône secondaire « VIS »**

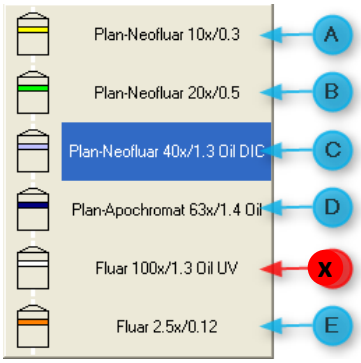
pour activer le mode épifluorescence classique.
3. Ouvrez la fenêtre « Microscope Control » en cliquant sur l'icône secondaire « Micro »**

. Positionnez correctement cette fenêtre *(Voir Organisation de l'espace de travail - p.8)*.
4. Descendez les objectifs au maximum (jusqu'à entendre des bips) en tournant une vis macrométrique vers vous *(Voir Ce que vous pouvez faire sur le microscope – p.16 – point 1)*.
5. Choisissez votre objectif :

   ↳ Dans la fenêtre « Microscope Control », cliquez sur l'icône « Objective » *(Voir Copie d'écran 11 : Fenêtre "Microscope Control" 2 – p.15 – Point F)* puis sur l'objectif de votre choix.

   Les objectifs à votre disposition sont les suivants :

   - **A.** 10x sec (JAMAIS D'HUILE SUR CET OBJECTIF)
   - **B.** 20x sec (JAMAIS D'HUILE SUR CET OBJECTIF)
   - **C.** 40x Immersion **HUILE (UTILISEZ UNE GOUTTE DU MILIEU D'IMMERSION HUILE UNIQUEMENT)**
   - **D.** 63x Immersion **HUILE (UTILISEZ UNE GOUTTE DU MILIEU D'IMMERSION HUILE UNIQUEMENT)**
   - **E.** 2,5x sec (JAMAIS D'HUILE SUR CET OBJECTIF)



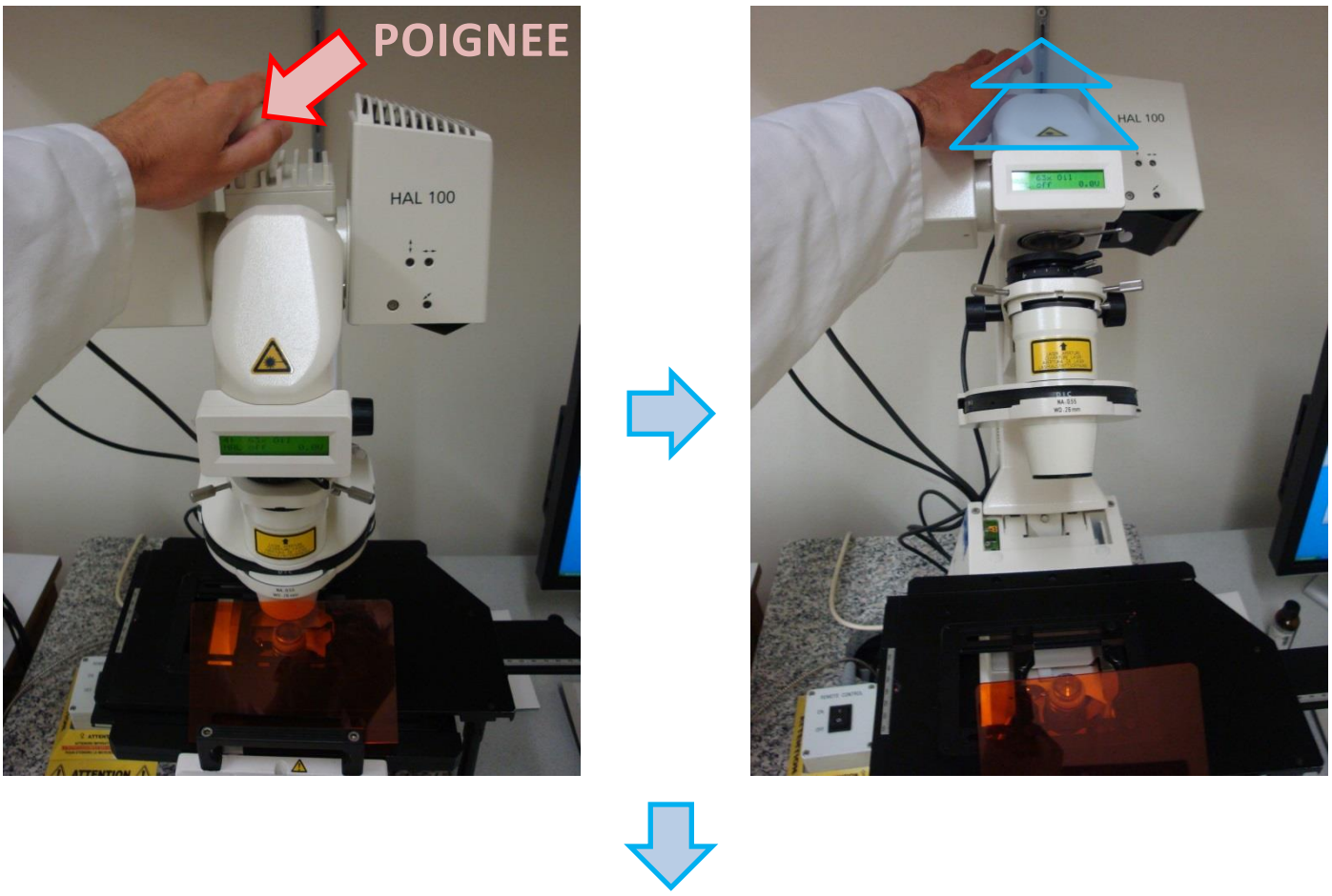
Copie d'écran 12 : Liste Objectifs

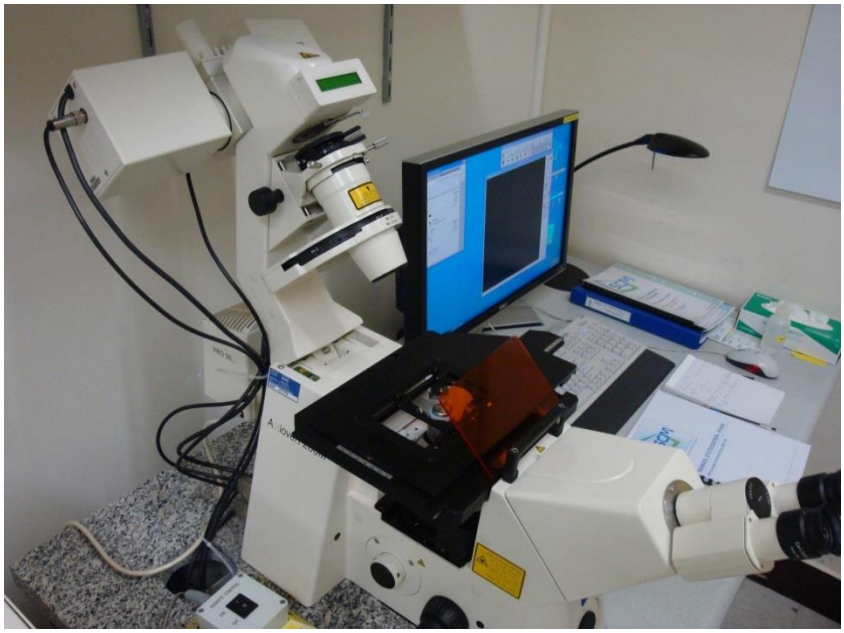
* *Voir Copie d'écran 1 : Fenêtre principale du logiciel – p.3*

** *Voir Tableau 1 : Icônes principales et secondaires – p.3*

L'objectif se met alors en place.

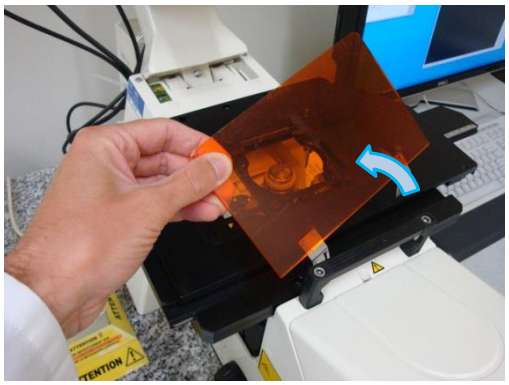
6. Basculez la tête du statif vers l'arrière en poussant délicatement sur la poignée prévue à cet effet (N'UTILISEZ QUE LA POIGNEE POUR POUSSER LA TETE DU STATIF).





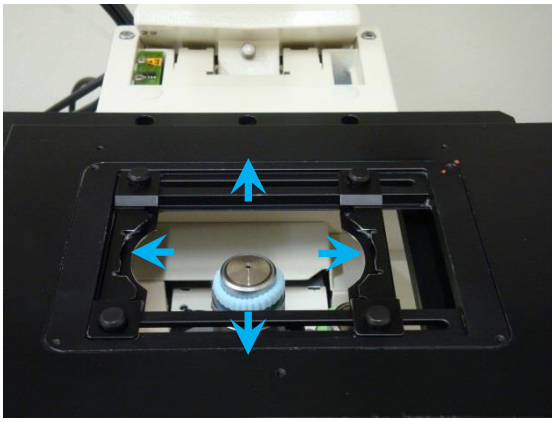
Photo(s) 9 : Bascule de la tête du statif

7. Retirez l'écran de protection pour la fluorescence.



Photo(s) 10 : Retrait écran de protection

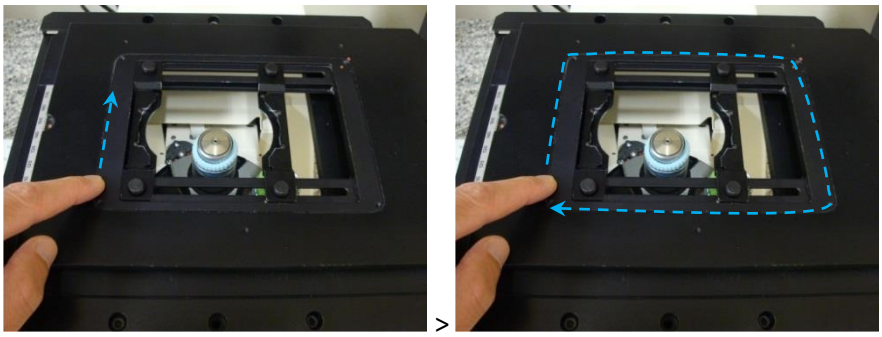
8. A l'aide du joystick X/Y, centrez la platine par rapport à l'objectif.



Photo(s) 11 : Centrage platine

9. Vérifiez que le porte-objet est correctement monté sur la platine :

↳ Posez 1 doigt sur la jonction porte-objet/platine est faites le tour.

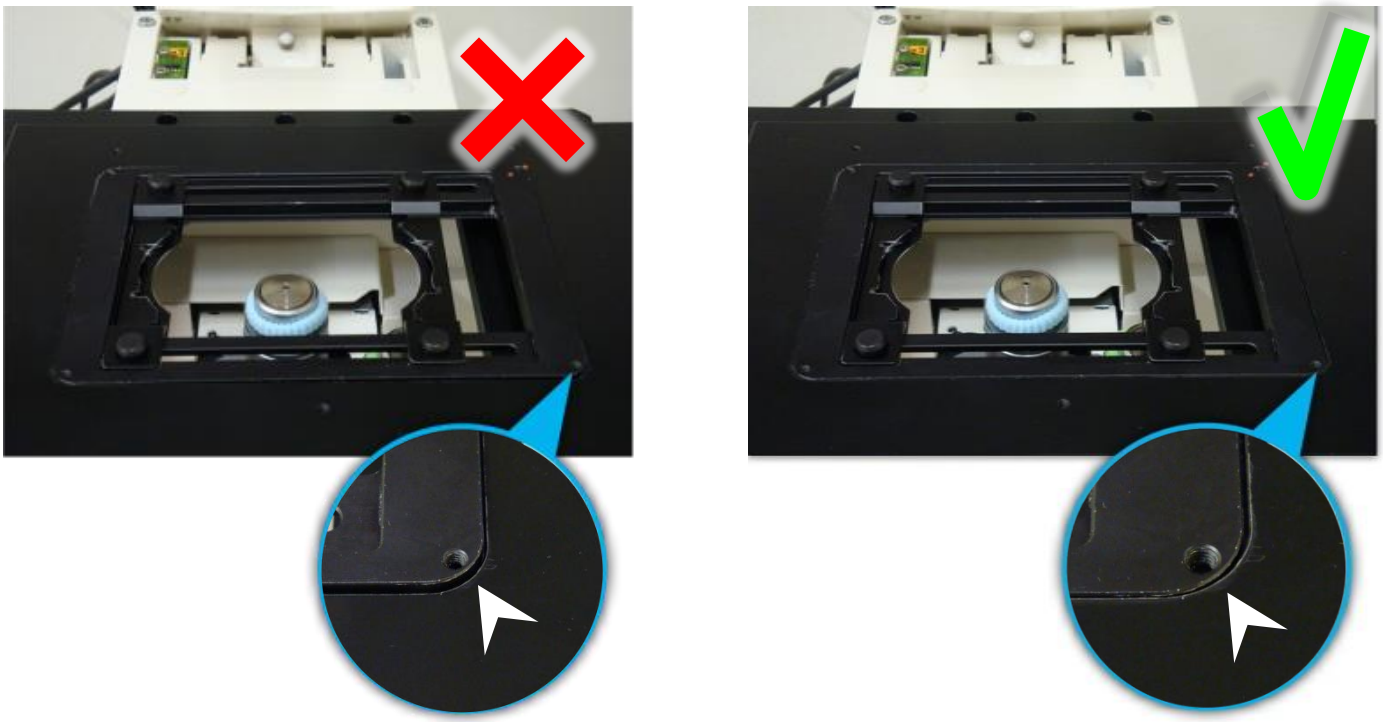


Photo(s) 12 : Vérification porte-objet

⊗ ***ATTENTION / A NE PAS FAIRE :***

NE PASSEZ JAMAIS VOS DOIGTS SUR LES OBJECTIFS QUAND VOUS VERIFIEZ QUE LE PORTE-OBJET EST BIEN MONTE.

Si le porte-objet est positionné correctement, passez directement à l'étape 11 sinon, suivez l'étape 10.

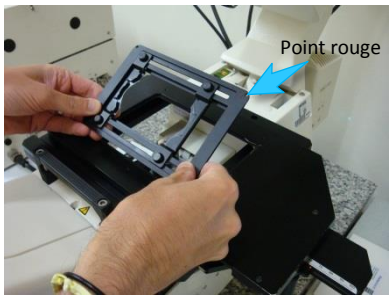


Photo(s) 13 : Vérification de la platine

Etape facultative (10) – Mise en place du Porte-Objet

10. A réaliser uniquement si le porte objet n'est pas monté ou mal monté sur la platine.
Montez correctement le porte-objet sur la platine :

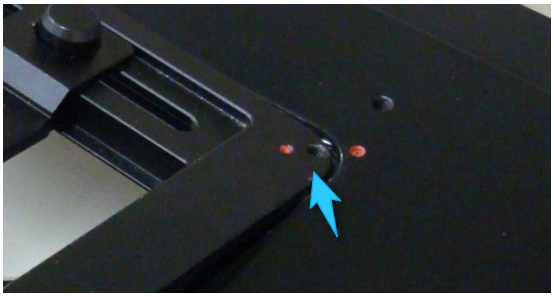
↳ Tenez le porte-objet avec les 2 mains : La main gauche tenant le côté gauche en bas et la main droite tenant le côté droit en bas. Le point rouge doit être en haut à droite.



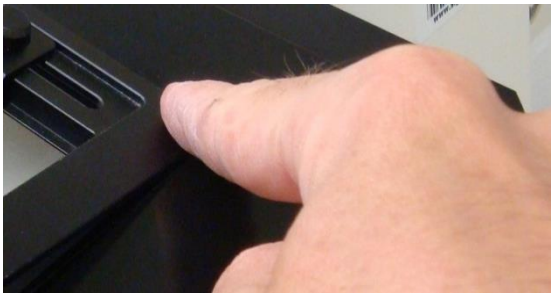
Photo(s) 14 : Mise en place du porte-objet

↳ Posez délicatement le coin avec le point rouge du porte-objet dans le coin de la platine avec le point rouge:

Zoom >



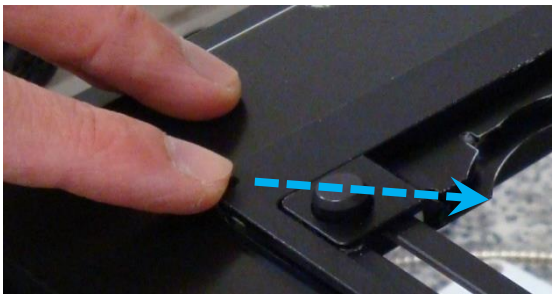
↳ Maintenez les 2 points rouges face à face en posant un doigt dans ce coin entre le porte-objet et la platine.

Zoom >


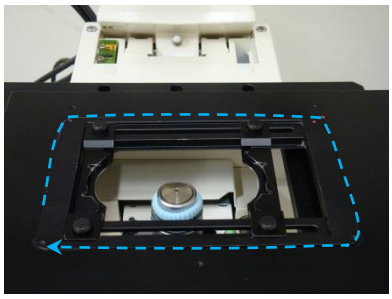
↳ Posez ensuite le coin en bas à gauche délicatement sans essayer de l'enclencher (et en gardant votre doigt sur les 2 points rouges.

Zoom >

↳ Poussez le coin en bas à gauche délicatement vers le coin en haut à droite pour enclencher le porte-objet (Pendant cette opération maintenez la platine pour qu'elle bouge le moins possible).

Zoom >


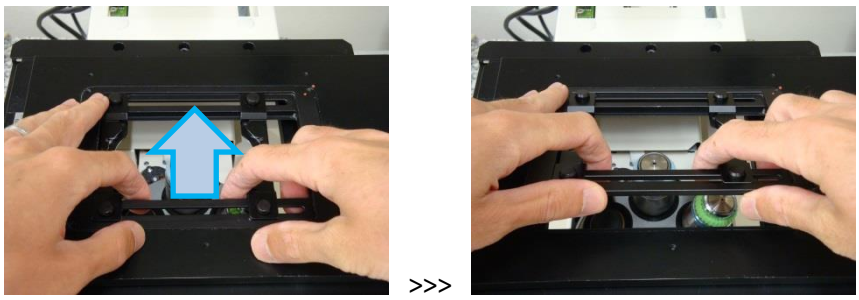
↳ Vérifiez que votre porte-objet est correctement monté.



⊗ ***ATTENTION / A NE PAS FAIRE :***

Soyez très attentif quand vous mettez en place le porte-objet. Assurez-vous de ne **JAMAIS** toucher les objectifs avec le porte-objet.

↳ Pour retirer le porte-objet, tirez simplement la partie basse vers le haut :



Fin étape facultative

11. Si vous avez choisi un objectif sec (2,5, 10x ou 20x) passez directement à l'étape 12.
Si vous avez choisi un objectif à immersion, déposez une petite goutte de milieu d'immersion sur l'objectif que vous avez choisi à l'étape 5.
Utilisez le plat du pinceau pour déposer votre goutte d'huile.

Photo(s) 15 : Dépôt milieu d'immersion

⊗ ***ATTENTION / A NE PAS FAIRE :***

Ne déposez pas trop d'huile sur l'objectif. Une petite goutte suffit. Si vous avez déposé trop d'huile, nettoyez immédiatement l'objectif avec du papier optique et redéposez une petite goutte d'huile.

12. Positionnez votre lame sur le porte-objet. Posez votre lame sur la griffe gauche, puis sur la droite et poussez la griffe droite pour maintenir votre lame correctement.

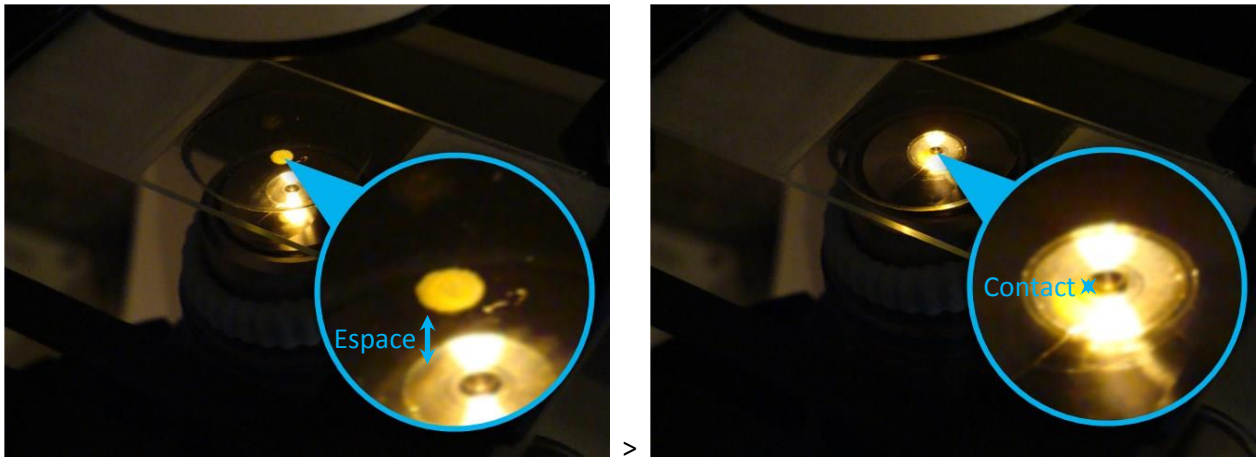
Photo(s) 16 : Mise en place de la lame

△ ***Attention :***

Le statif étant inversé, posez bien votre lame avec la **lamelle en dessous** (vers les objectifs).

13. Allumez la lampe halogène et réglez l'intensité de façon à visualiser un spot de lumière*.
14. Centrez votre échantillon dans le spot de lumière grâce au joystick x/y*.

15. Si vous utilisez un objectif sec, passez directement à l'étape 17.
    Si vous avez choisi un objectif à immersion, montez à l'œil nu les objectifs avec une vis macrométrique jusqu'à ce que l'huile entre en contact avec la lamelle de votre échantillon. Recentrez au besoin votre échantillon dans le spot de lumière.



Photo(s) 17 : Approche de l'objectif

Information complémentaire :

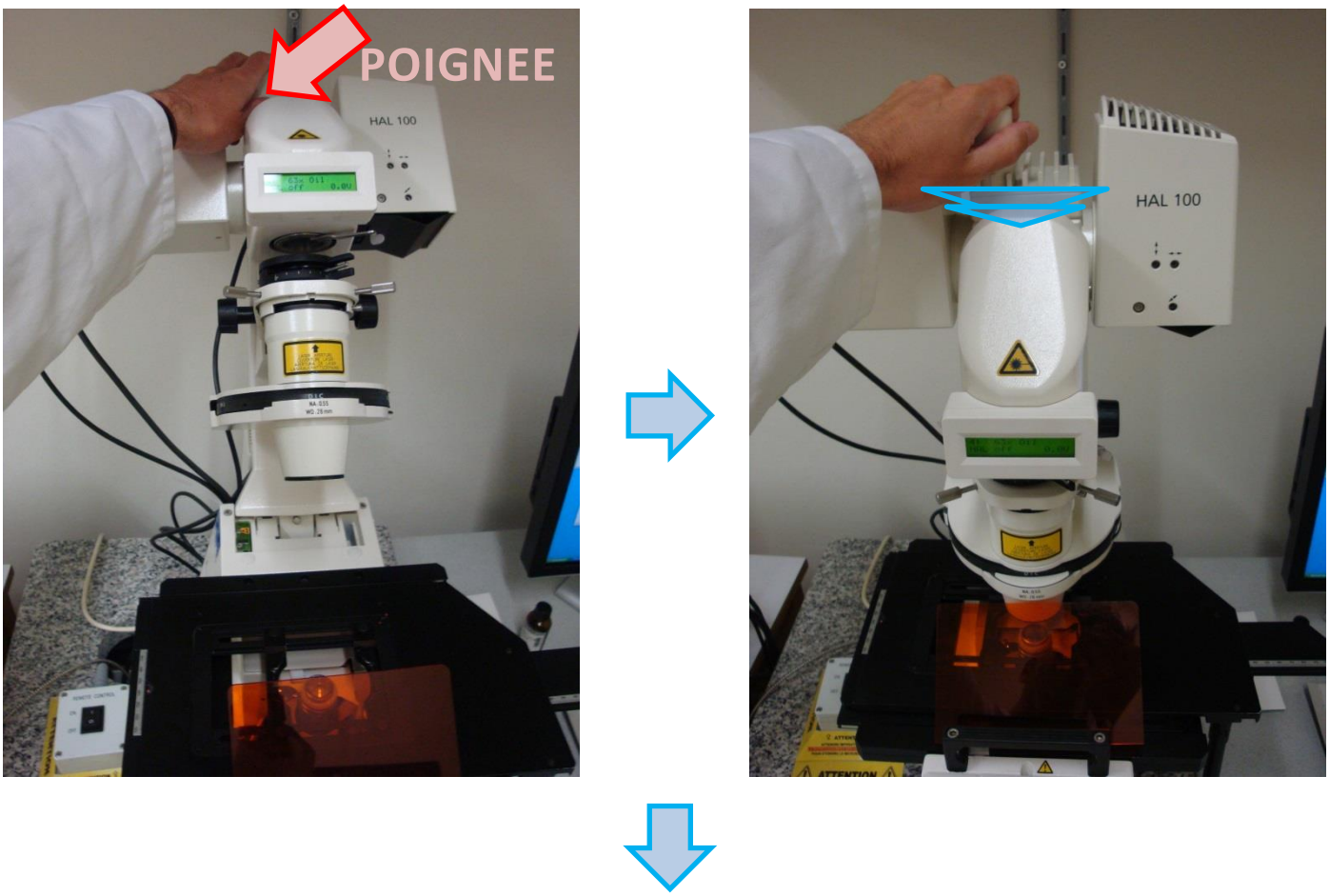
Utilisez la vis macrométrique pour approcher l'objectif de la lame. Tournez doucement la vis macrométrique vers le mur pour monter. L'huile est en contact avec l'objectif quand vous voyez l'huile s'étaler légèrement sur la lamelle.

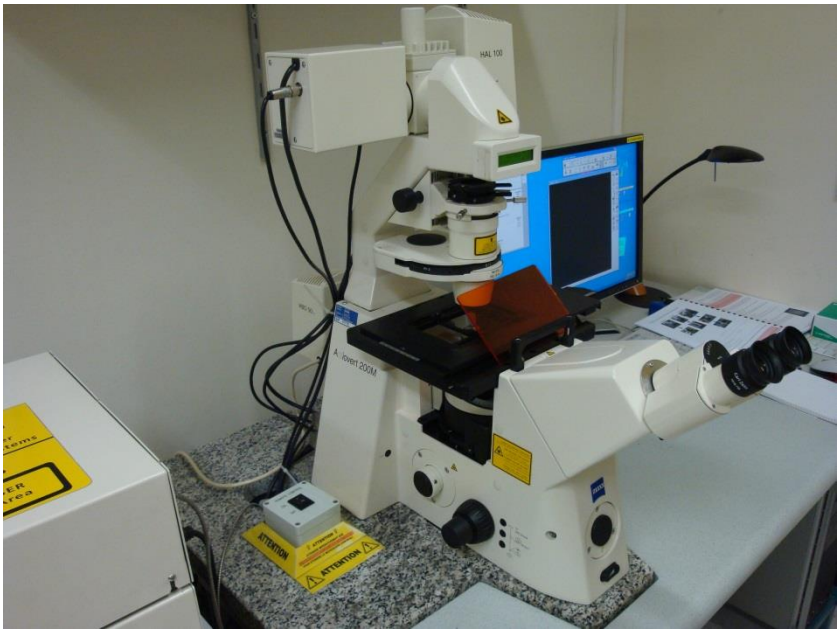
16. Coupez la lampe halogène*.

L'échantillon est maintenant installé. Si vous avez le moindre doute ou si vous rencontrez une difficulté rapprochez-vous immédiatement du Responsable de la Plate-Forme.

17. Remettez en place la tête du statif en tirant délicatement sur la poignée prévue à cet effet (N'UTILISEZ QUE LA POIGNEE POUR TIRER LA TETE DU STATIF) :

* *Voir Initiation pilotage/manipulation du microscope – p.15*





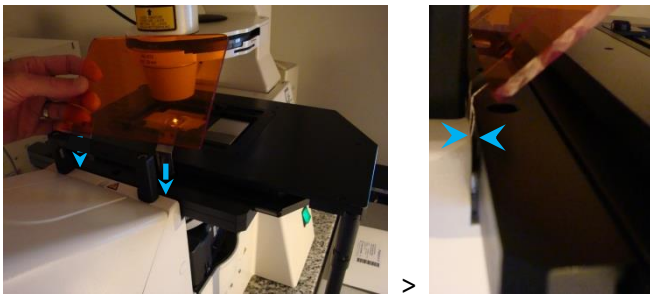
Photo(s) 18 : Bascule de la tête du statif

Réalisation de la mise au point

Vous devez être en mode « VIS » *(Voir Installation de l'échantillon – p.18 – Etape 2)*.

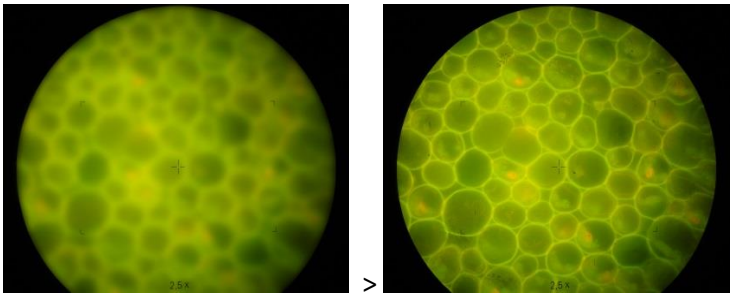
Pour faire la mise au point en fluorescence :

1. Mettez en place l'écran de protection pour la fluorescence (Les lames métalliques se positionnent entre la platine et le statif).



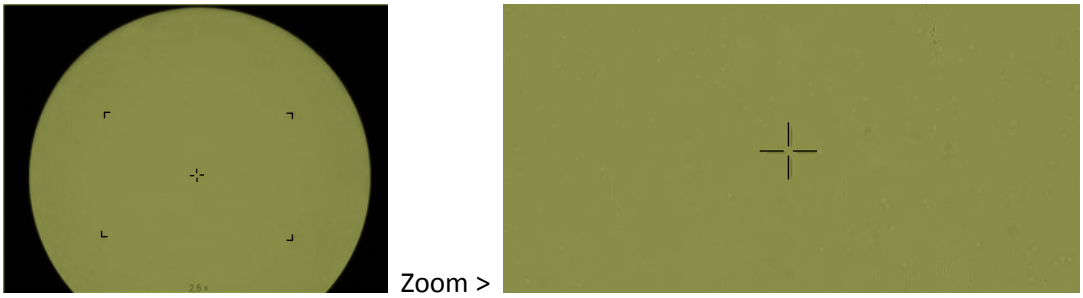
Photo(s) 19 : Ecran de protection

2. Choisissez un cube de fluorescence*.
3. Ouvrez le shutter de la lampe fluo *.
4. Regardez dans les oculaires (Réglez l'écartement interpupillaire si besoin).
5. Ajustez la mise au point en tournant délicatement UNE vis micrométrique (à gauche ou à droite).



Photo(s) 20 : Mise au point

6. Quand vous avez votre mise au point, centrez votre champ d'intérêt sur le réticule présent dans l'oculaire droit.



Photo(s) 21 : Réticule de visée

* *Voir Initiation pilotage/manipulation du microscope – p.15*

Vous pouvez mettre au point le réticule en tournant uniquement le haut de l'oculaire droit.

7. Regardez, si vous le souhaitez, les autres fluorochromes en changeant le cube de fluorescence*.
8. Coupez le shutter*.

A savoir / Notez-bien :

D'une manière générale pensez à couper dès que possible la lumière d'excitation fluo en fermant le shutter pour éviter de photoblanchir votre échantillon.

Pour faire la mise au point en lumière blanche :

1. Mettez en place une position vide au niveau de la tourelle de cube de fluorescence*.
2. Allumez la lumière transmise*.
3. **Baissez l'intensité de la lumière en utilisant le curseur de réglage sur le statif*.**
4. Regardez dans les oculaires (Réglez l'écartement interpupillaire si besoin).
5. Ajustez l'intensité de la lumière en utilisant le curseur de réglage sur le statif*.
6. Ajustez la mise au point en tournant délicatement UNE vis micrométrique (à gauche ou à droite).
7. Quand vous avez votre mise au point, centrez votre champ d'intérêt sur le réticule présent dans l'oculaire droit. Vous pouvez mettre au point le réticule en tournant uniquement le haut de l'oculaire droit.
8. Eteignez la lumière transmise*.

Attention :

La technique de mise au point est assez délicate à maîtriser lors des premières utilisations du microscope. Prenez votre temps pour réaliser votre mise au point. Vérifiez régulièrement la montée de l'objectif par rapport à l'échantillon pour éviter toute casse de votre lame et de l'optique.

N'hésitez pas vous rapprocher du Responsable de la Plate-Forme en cas de besoin.

La mise au point de l'échantillon est maintenant terminée. Si vous avez le moindre doute ou si vous rencontrez une difficulté rapprochez-vous immédiatement du Responsable de la Plate-Forme.

* *Voir Initiation pilotage/manipulation du microscope – p.15*

Réalisation de la configuration confocale

Afin comprendre plus facilement la procédure de configuration du trajet optique en mode confocal, nous utiliserons un exemple concret.

Description de l'exemple

Pour réaliser la configuration confocale nous nous appuierons sur l'échantillon suivant intitulé « Lame de démo » :

- ➔ Coupe de racine de Convallaria avec un triple marquage :
  - ↳ **Alexa 488**
  - ↳ **TRITC**
  - ↳ **To-Pro 3**

Ce type de triple marquage est très utilisé en microscopie photonique quand l'utilisation du DAPI n'est pas possible.

Le but de ce chapitre est de paramétrer le trajet optique en mode confocal afin de pouvoir visualiser les 3 éléments marqués de notre échantillon (Alexa 488, TRITC et To-Pro 3 *voir ci-dessus*).

Les informations concernant l'exemple seront bordées de cette ligne |.

Connaître ses fluorochromes

Avant de vous lancer dans la configuration du trajet optique confocal, il est primordial que vous connaissiez les spectres d'excitation et d'émission des fluorochromes présents dans votre échantillon. Ici nous avons dans la lame de démo : de l'Alexa 488, du TRITC et du To-Pro 3.

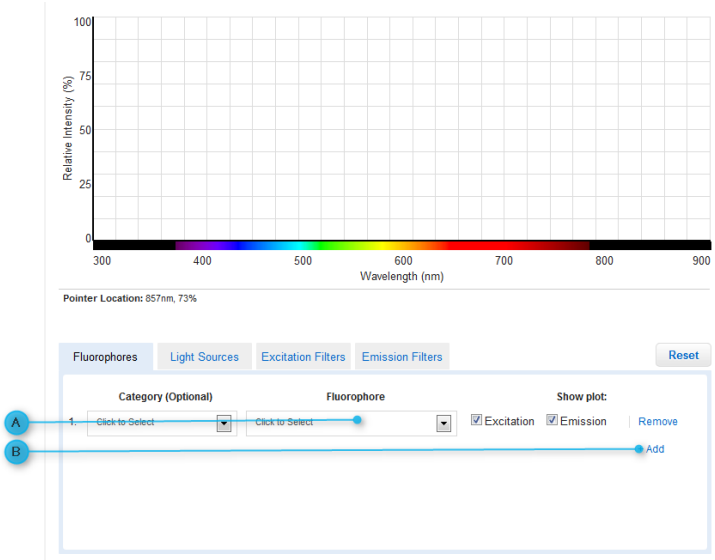
Pour connaître l'allure des spectres d'excitation et d'émission :

1. Rendez-vous sur le site internet de « Life Technologies » dans la rubrique « SpectraViewer ».
   a. Cliquez sur l'icône « Mozilla Firefox » dans la barre de tâche Windows ou sur le bureau.
   b. Cliquez sur le raccourci SpectraViewer dans la barre de tâche Firefox (en haut de la fenêtre).
   (Adresse : http://www.lifetechnologies.com/fr/fr/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html)

Légende :

A- Choix des fluorochromes

B- Ajout de fluorochrome

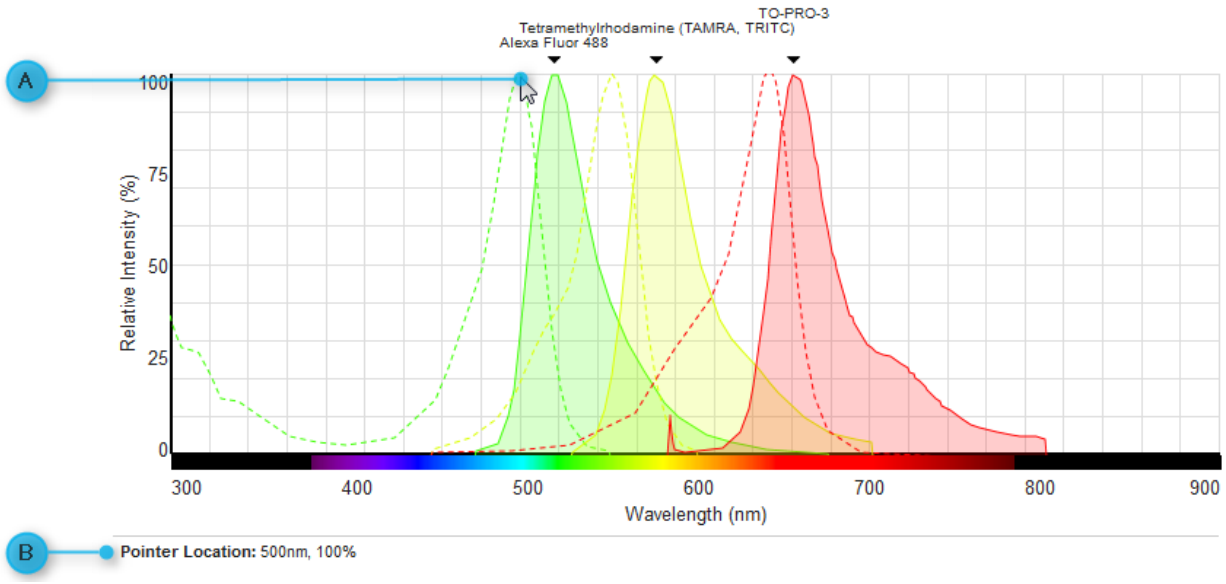


Copie d'écran 13 : Fenêtre SpectraViewer

2. Sélectionnez vos fluorochromes grâce au menu déroulant *(voir Copie d'écran 13 : Fenêtre SpectraViewer - Icône A)*.
   Utilisez « + Add » pour ajouter des fluorochromes *(voir Copie d'écran 13 : Fenêtre SpectraViewer - Icône B)*.

   Ici nous avons donc sélectionné : Alexa 488, TRITC et To-Pro 3.

3. Visualisez les spectres d'excitation et d'émission des fluorochromes de l'échantillon.
   Passez le curseur de la souris sur les spectres pour visualiser les valeurs de longueurs d'ondes aux différents pics.



Copie d'écran 14 : Spectres des fluorochromes

Légende :

En pointillés : Spectre d'excitation
En continu : Spectre d'émission

A- Pic d'un spectre
B- Valeurs correspondante au niveau du pointeur de la souris

4. Pour chaque fluorochrome, notez la valeur du pic d'excitation et du pic d'émission en remplissant le tableau ci-dessous (vous trouverez des tableaux vierges sur le bureau) :

Fluorochrome(s)	Valeur du Pic d'excitation (nm)	Raie d'excitation (nm)	Valeur du Pic d'émission (nm)
…	…	…	…

Disponible en téléchargement sur le site du SCM à la rubrique « Documentation »

Pour notre exemple nous avons :

Fluorochrome(s)	Valeur du Pic d'excitation (nm)	Raie d'excitation (nm)	Valeur du Pic d'émission (nm)
Alexa 488	498 nm		520 nm
TRITC	555 nm		580 nm
TO-PRO 3	643 nm		657 nm

Configuration du trajet optique en mode confocal

Le trajet optique en mode confocal est composé des éléments suivants :

- 1 banc lasers.
- 1 jeu de miroirs dichroïques principaux (pour réfléchir le ou les raies lasers sur l'échantillon).
- 1 jeu de miroirs dichroïques secondaires (pour réfléchir ou non les longueurs d'ondes d'émission vers le détecteur n°2).
- 1 jeu de filtre devant le PMT-Fluo 1
- 1 jeu de filtre devant le PMT-Fluo 2
- 2 détecteurs pour la fluorescence (2 photomultiplicateurs simples : les PMT-Fluo).
- 1 détecteur pour la lumière transmise (PMT-Trans).

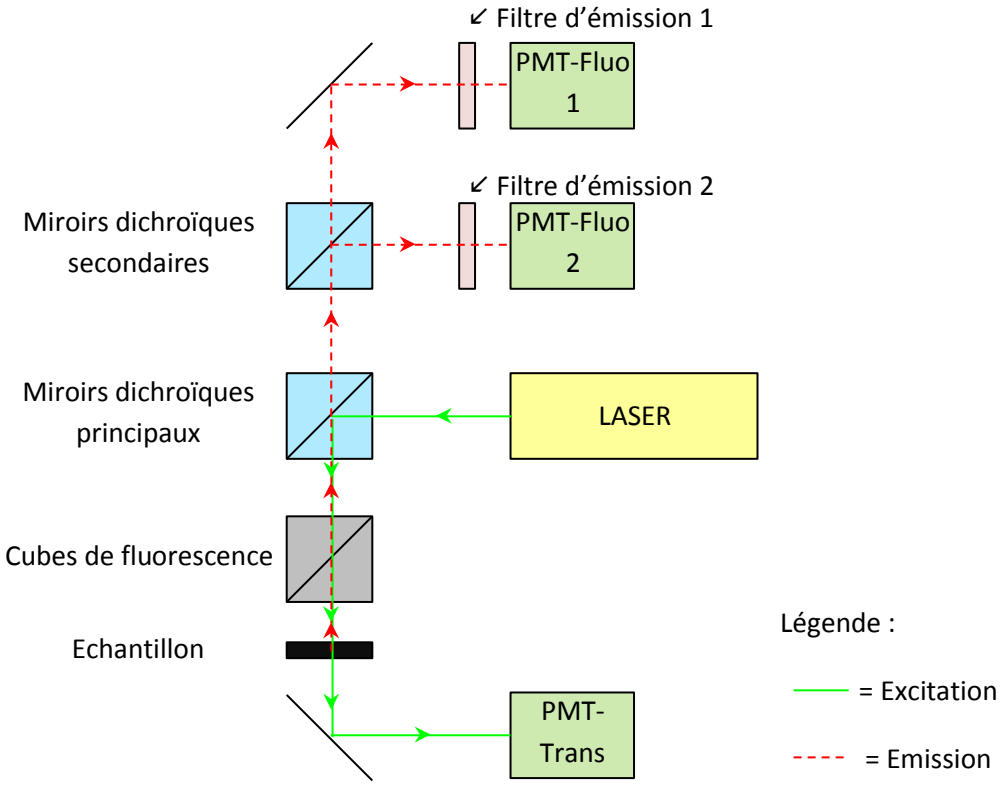
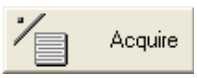


Schéma 1 : Trajet Optique en mode confocal

Allumage des LASERS

La première étape de la configuration consiste à allumer les lasers dont vous avez besoins.

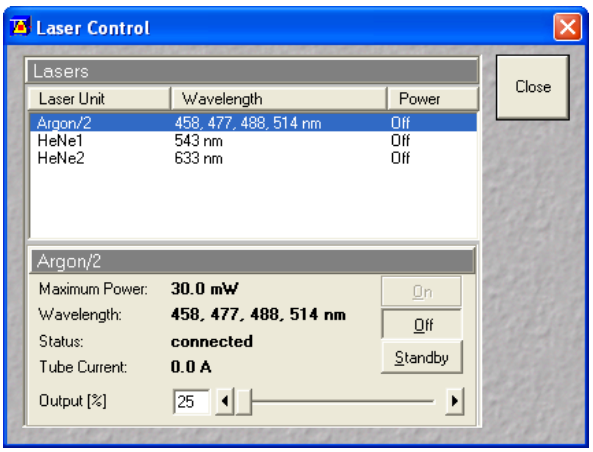
Pour cela, cliquez sur l'icône principale « Acquire »* 

puis sur l'icône secondaire « Laser »*

.

La fenêtre « Laser Control » s'ouvre vous montrant les différents lasers.

* *Voir Présentation du software – p.3*



Copie d'écran 15 : Fenêtre « Laser Control »

Aidez-vous du tableau que vous avez rempli page 29. Regardez les valeurs des pics d'excitation de vos fluorochromes pour savoir quel laser allumer.

3 lasers sont à notre disposition :

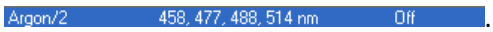
- **Argons/2** avec les raies 458, 477, 488 et 514 nm.
- **HeNe1** avec la raie 543 nm.
- **HeNe2** avec la raie 633 nm.

Notre tableau de fluorochromes est le suivant :

Fluorochrome(s)	Valeur du Pic d'excitation (nm)	Raie d'excitation (nm)	Valeur du Pic d'émission (nm)
Alexa 488	498 nm		520 nm
TRITC	555 nm		580 nm
TO-PRO 3	643 nm		657 nm

Le pic d'excitation de l'Alexa étant 498 nm, la raie qui excitera au mieux ce fluorochrome est la raie 488. Nous devons donc allumer le laser Argon/2.

Pour allumer le laser Argon/2 :

1. Dans la fenêtre « Laser Control », cliquez sur la ligne de l'Argon/2 pour la mettre en surbrillance 

.
2. Cliquez sur Standby

et rien d'autre (Ne cliquez jamais sur « On »).

Le pic d'excitation du TRITC étant de 555 nm, la raie qui excitera au mieux ce fluorochrome est la raie 543. Nous devons donc allumer le laser HeNe1.

Pour allumer le laser HeNe1 :

1. Dans la fenêtre « Laser Control », cliquez sur la ligne du HeNe1 pour la mettre en surbrillance.
2. Cliquez sur « On ».

Le pic d'excitation du To-Pro 3 étant de 643 nm, la raie qui excitera au mieux ce fluorochrome est la raie 633. Nous devons donc allumer le laser HeNe2

Pour allumer le laser HeNe2 :

1. Dans la fenêtre « Laser Control », cliquez sur la ligne du HeNe2 pour la mettre en surbrillance.
2. Cliquez sur « On ».

Complétez votre tableau en indiquant pour chaque fluorochrome la raie d'excitation correspondante :

Fluorochrome(s)	Valeur du Pic d'excitation (nm)	Raie d'excitation (nm)	Valeur du Pic d'émission (nm)
Alexa 488	498 nm	488 nm	520 nm
TRITC	555 nm	543 nm	580 nm
TO-PRO 3	643 nm	633 nm	657 nm

Tableau 2 : Tableau d'expérience rempli

Les types de configurations : Single vs Multi-Tracks

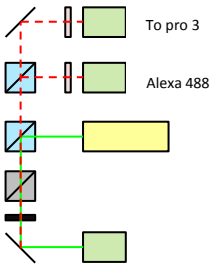
2 solutions s'offrent à vous pour faire une acquisition confocale :

- Vous pouvez utiliser le mode « single track » qui vous permet de faire une acquisition confocale en utilisant une seule fois le trajet optique confocal.
  Cette solution vous permet de faire l'acquisition de 1 ou 2 fluorochromes maximum (l'acquisition des 2 fluorochromes étant simultanée).

- Vous pouvez utiliser le mode « multi tracks » pour faire une acquisition confocale en utilisant plusieurs fois le trajet optique confocal.
  Cette solution vous permet de multiplier les tracks pour faire des acquisitions séquentielles.

Exemple :

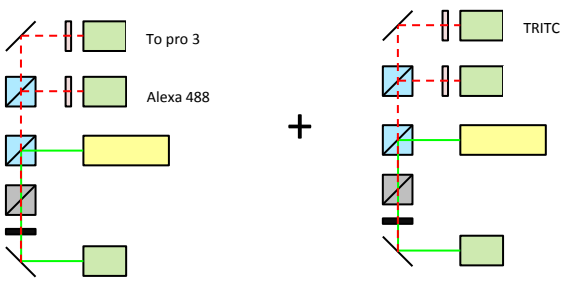
Single track :



Track 1

Track unique pour l'acquisition de Alexa 488 et To Pro 3 en simultané.

Multi tracks :



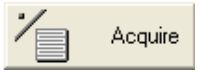
Track 1 Track2

Track 1 puis track 2 pour l'acquisition de Alexa 488 et To-Pro 3 (en simultané dans la track 1) puis de TRITC (en séquentielle dans la track 2).

△ ***Attention :***

Veuillez à ce que la séparation spectrale des fluorochromes soit suffisante pour faire une acquisition simultanée. Dans le cas contraire, vous risquez fortement de vous retrouver avec de la fuite spectrale (par exemple, détection de l'émission du fluorochrome Alexa 488 au niveau du détecteur dédié à la détection du fluoroschrome TRITC).

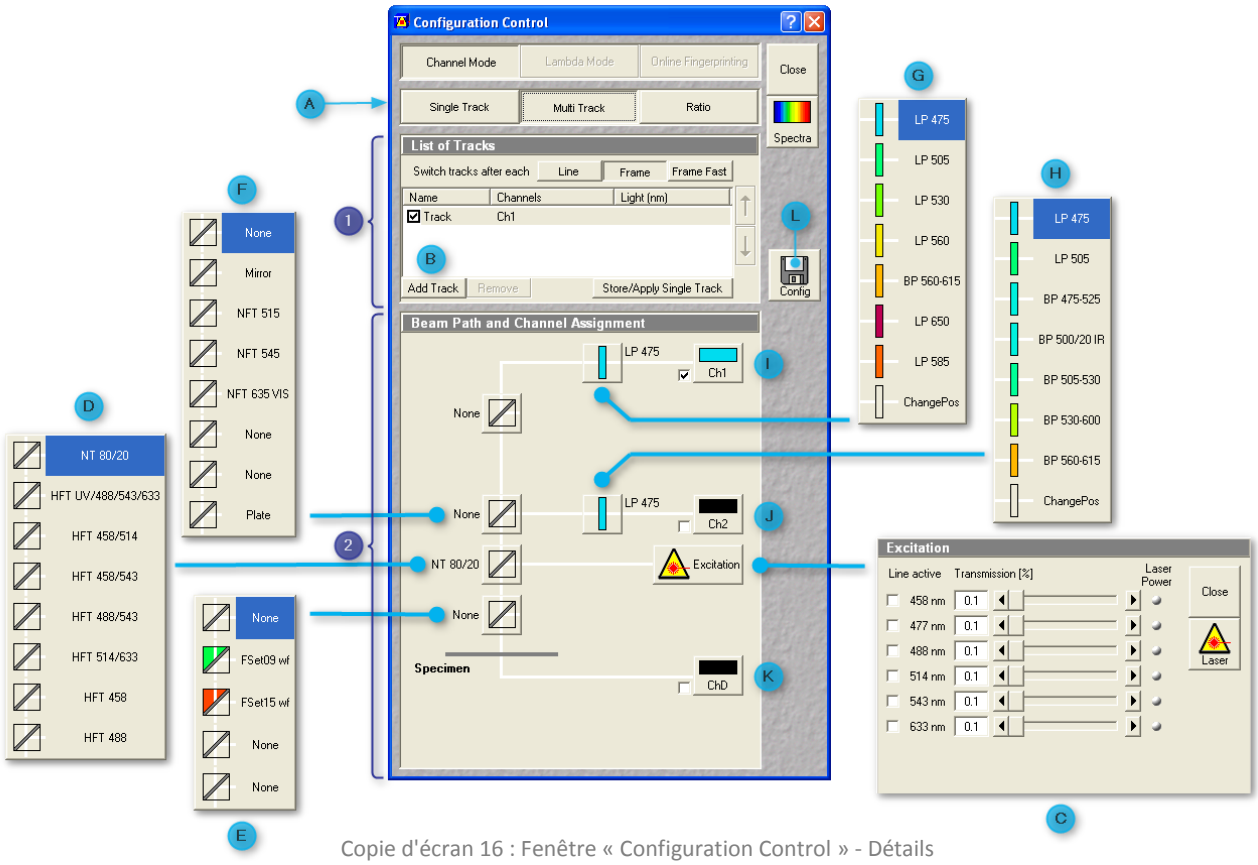
Pour réaliser la suite de votre configuration :

1. Cliquez sur l'icône principale « Acquire »* 

puis sur l'icône secondaire « Config »*

.
La fenêtre « Configuration control » s'ouvre vous montrant le trajet optique du microscope en mode confocal.

La fenêtre « Configuration control »



Copie d'écran 16 : Fenêtre « Configuration Control » - Détails

Légende :

1- Zone de sélection des Tracks
2- Zone de configuration des Tracks. Les informations affichées dans cette zone ne concernent que la Track sélectionnée en zone 1

A- Choix du mode « Single » ou «Multi Tracks »
B- Gestion des tracks (Ajout, Suppression, Nom)
C- Choix des raies lasers
D- Choix du miroir dichroïque principal
E- Zone des cubes de fluorescence
F- Choix du miroir dichroïque secondaire

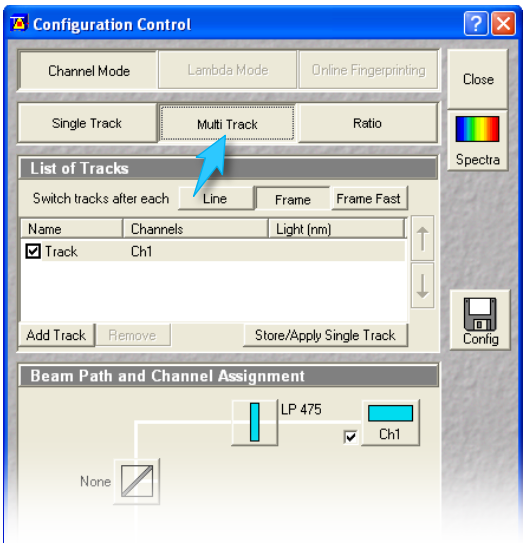
G- Filtre d'émission du PMT-Fluo 1
H- Filtre d'émission du PMT-Fluo 2
I- PMT-Fluo 1
J- PMT-Fluo 2
K- PMT-Trans
L- Sauvegarde de configuration

* *Voir Présentation du software – p.3*

2. Positionnez cette fenêtre correctement comme indiqué au paragraphe « Organisation de l'espace de travail » page 8.

3. Choisissez maintenant votre type de configuration

Pour notre exemple nous avons 3 fluorochromes à détecter. Nous choisissons donc le mode multi-tracks :

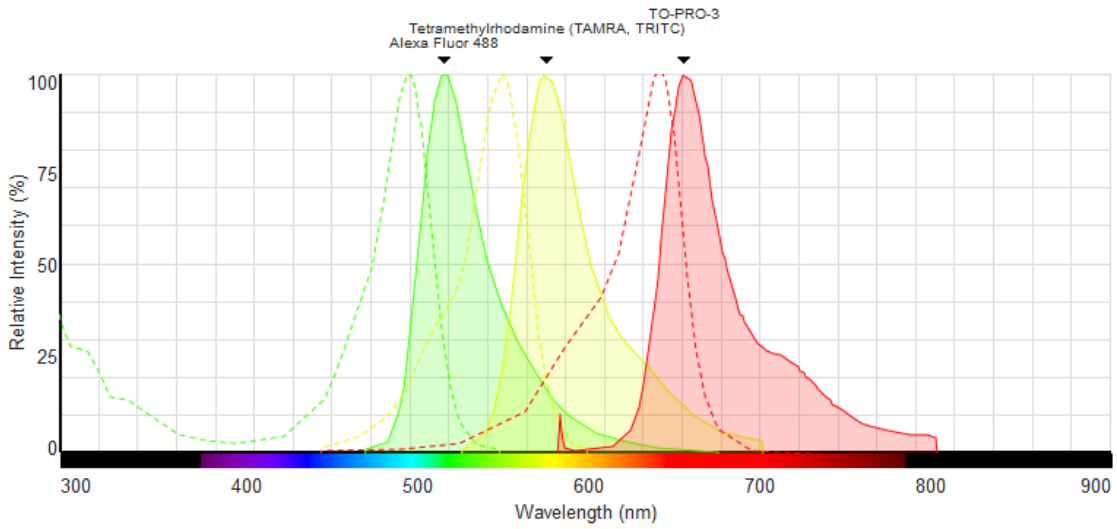


Copie d'écran 17 : Fenêtre « Configuration Control » - Choix du mode

4. Une fois le type de configuration sélectionné, cliquez sur « add track »

(voir Copie d'écran 16 : Fenêtre « Configuration Control » - Détails – p.33 –Zone 1) pour ajouter le nombre de tracks que vous souhaitez.

Dans notre exemple, nous avons 3 fluorochromes. Pour faire l'acquisition de ces 3 fluorochromes nous pouvons soit utiliser 3 tracks (1 track par fluorochrome soit utiliser 2 tracks (acquisition de 2 fluorochromes dans la track 1 et 1 fluorochrome dans la track 2). L'utilisation de 2 tracks au lieu de 3 nous ferait gagner du temps. Mais pour pouvoir acquérir simultanément 2 fluorochromes, souvenez-vous qu'ils doivent être suffisamment séparés spectralement. Vérifions avec les fluorochromes de notre exemple :



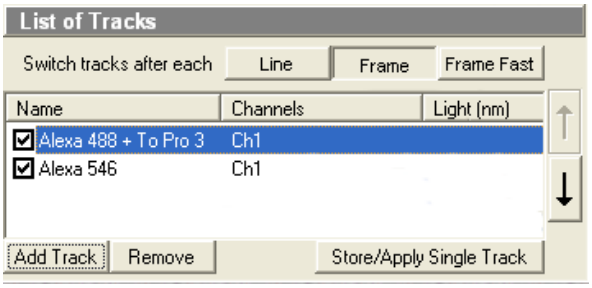
Copie d'écran 18 : Spectres des fluorochromes de la lame de démo

Sur la Copie d'écran 18 ci-dessus, nous voyons que l'alexa 488 et le TRITC sont proches spectralement.
Le TRITC et le To-Pro 3 sont aussi proches spectralement.
Par contre l'Alexa 488 et le To-Pro 3 sont assez éloignés spectralement.

Nous allons donc pouvoir utiliser 2 tracks pour faire l'acquisition des 3 fluorochromes :

- ↳ Track 1 pour Alexa 488 et To-Pro 3 en simultané
- ↳ Track 2 pour TRITC en séquentiel

5. Renommez les « Tracks » afin de faciliter la réalisation de la configuration *(voir Copie d'écran 16 : Fenêtre « Configuration Control » - Détails – p.33 – Zone 1)*.



Pour renommer une track, cliquez sur la track pour la mettre en surbrillance puis recliquez une nouvelle fois sur cette track.

Copie d'écran 19 : Nom des tracks

6. Configurez chacune des tracks créées.

Dans notre exemple, nous avons 2 tracks.

Configuration de la Track 1 : « Alexa 488 + To Pro 3 »

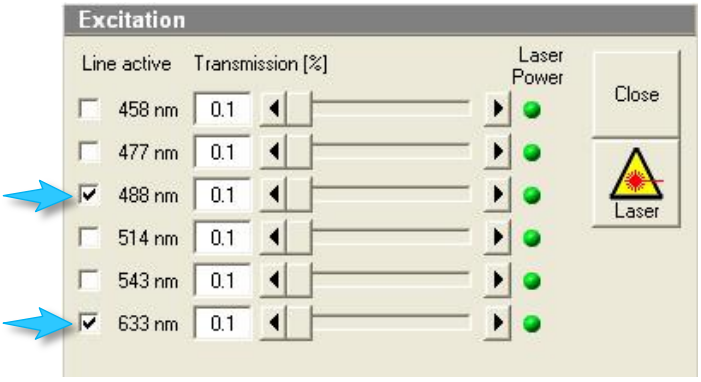
Toujours dans la fenêtre « Configuration Control » :

a- Dans zone « List of tracks », cliquez sur la track que vous souhaitez configurer pour la mettre en surbrillance. Dans la Copie d'écran 19, la track « Alexa 488 + To-Pro 3 » est sélectionnée.

b- Cliquez sur l'icône « Excitation »

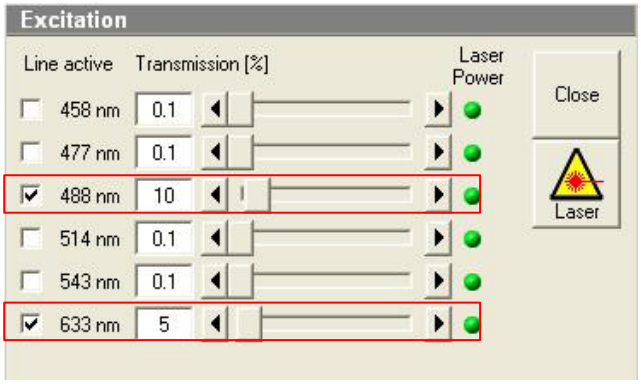
pour ouvrir les options concernant les lasers.

c- Cochez les lasers à envoyer sur l'échantillon pour les fluorochromes de cette track.
Nous avons vu précédemment que pour exciter l'Alexa 488 nous devions utiliser la raie 488 nm et que pour le To Pro 3 il nous fallait la raie 633 nm.
Cochons donc ces deux lasers :



Copie d'écran 20 : Option Excitation – Fenêtre « Configuration Control »

d- Afin de pouvoir exciter efficacement les fluorochromes, ajustez correctement le pourcentage de transmission pour l'ensemble des lasers précédemment cochés.
Le laser Argon/2 fait 30 mW. Pour l'ensemble des raies de ces lasers, veillez à ne pas dépasser les 10 % pour éviter au maximum le photobleaching (Vous pouvez évidemment ajuster cette valeur en cas de besoin. Par exemple, si à 10 % votre échantillon bleach très rapidement, pensez à diminuer cette valeur).
Le laser HeNe2 fait 5 mW. Pour commencer, vous pouvez régler le pourcentage de transmission entre 5 et 10% (Là aussi, ajustez en cas de besoin).



⚠ ***Attention :***

APPUYEZ BIEN SUR LA TOUCHE « ENTER » POUR VALIDER ET ENREGISTER VOTRE VALEUR DE POURCENTAGE DE TRANSMISSION..

Copie d'écran 21 : Réglage pourcentage de transmission lasers - 1

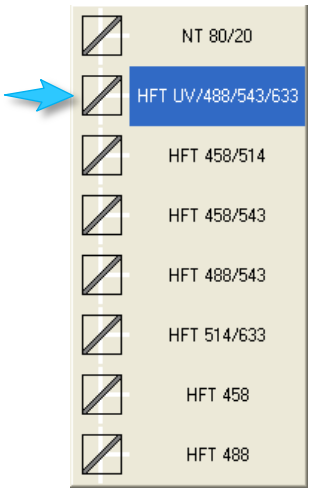
e- Cliquez sur l'icône des miroirs dichroïques principaux et sélectionnez le miroir dichroïque principal *(voir Copie d'écran 16 : Fenêtre « Configuration Control » - Détails – p.33 –Point D)* qui vous permettra de réfléchir sur l'échantillon les raies lasers sélectionnées précédemment (à l'étape f).

Les miroirs dichroïques principaux : HFT (Haupt Farb Teiler) réfléchissent uniquement les longueurs d'ondes d'onde indiquées. Par exemple un HFT 488

réfléchit uniquement 488 nm et rien d'autre. Un HFT 488/543

réfléchit 488 et 543 nm uniquement et rien d'autre.
Dans notre cas, nous devons réfléchir sur l'échantillon 488 et 633 nm. Nous choisissons donc le seul HFT capable de réfléchir ces 2 longueurs d'ondes à savoir le HFT UV/**488**/543/**633**

.



Copie d'écran 22 : Choix du miroir dichroïque principal - 1

Les raies lasers sont donc maintenant réfléchies sur l'échantillon.

f- Vérifiez que la zone des cubes de fluorescence est bien sur « None ». Dans le cas contraire mettez « None » *(voir Copie d'écran 16 : Fenêtre « Configuration Control » - Détails – p.33 –Point E)*.

g- L'échantillon est excité et émet maintenant les longueurs d'ondes d'émission.
Aidez-vous du tableau que vous avez rempli page 29. Regardez les valeurs des pics d'émission de vos fluorochromes.

Fluorochrome(s)	Valeur du Pic d'excitation (nm)	Raie d'excitation (nm)	Valeur du Pic d'émission (nm)
Alexa 488	498 nm	488 nm	520 nm
TRITC	555 nm	543 nm	580 nm
TO-PRO 3	643 nm	633 nm	657 nm

Dans notre cas, l'Alexa 488 émet à 520 nm et le To Pro 3 à 657 nm.

Le but est maintenant de séparer ces 2 émissions et de les détecter sur 2 détecteurs différents (PMT-Fluo 1 et PMT-Fluo 2). Pour cela, choisissez un miroir dichroïque secondaire NFT (Neben Farb Teiler) qui pourra séparer efficacement les 2 émissions.
Les miroirs NFT réfléchissent les longueurs d'ondes jusqu'à la longueur d'onde indiquée. Par exemple un NFT 515

réfléchit les longueurs d'ondes **JUSQU'A** 515 nm (avant 515 nm toutes les longueurs d'ondes sont réfléchies et après 515 nm toutes les longueurs d'ondes passent à travers le miroir).

Nous souhaitons dans notre cas séparer 520 nm et 657 nm. Nous mettons donc en place le NFT 545 nm

. Ce miroir réfléchit jusqu'à 545 nm. Ainsi, 520 nm est réfléchi mais 657 passe à travers le miroir dichroïque :

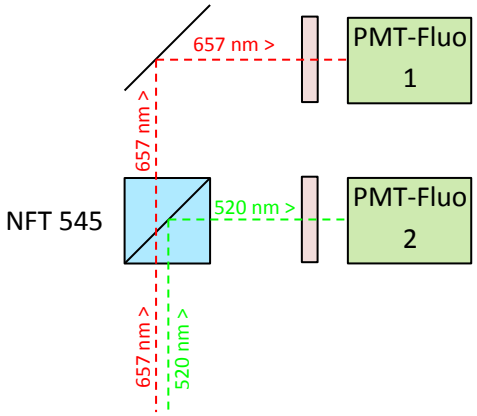


Schéma 2 : Séparation des émissions – Miroirs Dichroïques secondaire NFT

L'émission à 657 nm part vers le détecteur PMT-Fluo 1 et l'émission à 520 nm part vers le détecteur PMT-Fluo 2.

h- Cliquez sur l'icône « Filtre d'émission » du PMT-Fluo 1 et sélectionnez le filtre d'émission adéquat *(voir Copie d'écran 16 : Fenêtre « Configuration Control » - Détails – p.33 –Point G)*.
Le filtre d'émission doit vous permettre de laisser passer le pic d'émission du fluorochrome que vous souhaitez détecter. Il doit aussi vous permettre de bloquer la longueur d'onde d'excitation et bloquer l'émission de fluorescence des éventuels autres fluorochromes ayant de plus grandes longueurs d'ondes d'émission.

Type de filtres

Il existe 2 types de filtre d'émission :

- Les filtres LP (Long Pass) : Ces filtres laissent passer la lumière à partir de la longueur d'onde indiquée. Par exemple un filtre LP 560

bloque la lumière avant 560 nm mais laisse passer toutes les longueurs d'ondes à partir de 560 nm.
- Les filtres BP (Band Pass) : Ces filtres laissent passer la lumière entre les bornes indiquées. Par exemple un BP 560-615

bloque la lumière avant 560 nm et après 615 nm mais laisse passer toutes les longueurs d'ondes entre 560 et 615 nm.
Vous pouvez aussi trouver des filtres BP notés par exemple BP 500/20. LA 1ère valeur indique le centre de la bande passante et la seconde indique la largeur totale de la bande passante.
Un BP 500/20 est donc identique à un BP 490-510 (500 +/- 10 nm).

Dans notre cas, nous souhaitons détecter sur le PMT-Fluo 1 l'émission du To-Pro 3.
Aidez-vous de votre tableau afin de connaître les valeurs nécessaires au choix du filtre d'émission.

Fluorochrome(s)	Valeur du Pic d'excitation (nm)	Raie d'excitation (nm)	Valeur du Pic d'émission (nm)
Alexa 488	498 nm	488 nm	520 nm
TRITC	555 nm	543 nm	580 nm
TO-PRO 3	**643 nm**	**633 nm**	**657 nm**

Le To Pro 3 a été excité à 633 nm : Nous choisirons donc un filtre capable de bloquer 633 nm.
Le To Pro 3 a un pic d'émission à 657 nm : Nous choisirons donc un filtre capable de laisser passer 657nm.
Le To Pro 3 a la plus grande valeur de longueur d'onde d'émission. Il n'y a donc pas de fluorochrome derrière. Nous choisirons donc un filtre Long Pass.

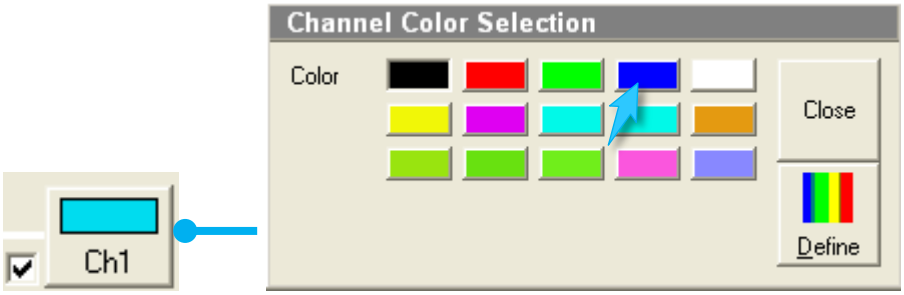
D'après les informations ci-dessus, nous devons donc choisir le filtre LP 650

(Ce filtre bloque les longueurs d'ondes avant 650 nm, laisse bien passer le pic d'émission 657 nm).

i- Cochez la case du détecteur PMT-Fluo 1 (Ch1).

(voir Copie d'écran 16 : Fenêtre « Configuration Control » - Détails – p.33 –Point I).

j- Cliquez sur l'icône « PMT-Fluo 1 » (CH1) puis sélectionnez la fausse couleur que vous souhaitez *(voir Copie d'écran 16 : Fenêtre « Configuration Control » - Détails – p.33 –Point I)*.



Copie d'écran 23 : Sélection fausse couleur - 1

k- Cliquez sur l'icône « Filtre d'émission » du PMT-Fluo 2 et sélectionnez le filtre d'émission adéquat *(voir Copie d'écran 16 : Fenêtre « Configuration Control » - Détails – p.33 –Point G)*.

Dans notre cas, nous souhaitons détecter sur le PMT-Fluo 2 l'émission de l'Alexa 488.
Aidez-vous de votre tableau afin de connaître les valeurs nécessaires au choix du filtre d'émission.

Fluorochrome(s)	Valeur du Pic d'excitation (nm)	Raie d'excitation (nm)	Valeur du Pic d'émission (nm)
Alexa 488	**498 nm**	**488 nm**	**520 nm**
TRITC	555 nm	543 nm	580 nm
TO-PRO 3	643 nm	633 nm	657 nm

L'Alexa 488 a été excité à 488 nm : Nous choisirons donc un filtre capable de bloquer 488 nm.
L'Alexa 488 a un pic d'émission à 520 nm : Nous choisirons donc un filtre capable de laisser passer 520 nm.
L'Alexa 488 n'a pas la plus grande valeur de longueur d'onde d'émission. Il y a donc des fluorochromes derrière. Nous choisirons donc un filtre Band Pass qui pourra bloquer l'émission des autres fluorochromes.

D'après les informations ci-dessus, nous devons donc choisir le filtre BP 505-530

(Ce filtre bloque les longueurs d'ondes avant 505 nm, laisse bien passer le pic d'émission de 520 nm et bloque les longueurs d'ondes après 530 nm).

l- Cochez la case du détecteur PMT-Fluo 2 (Ch2).

(voir Copie d'écran 16 : Fenêtre « Configuration Control » - Détails – p.33 –Point I).

m- Cliquez sur l'icône « PMT-Fluo 2 » (CH2) puis sélectionnez la fausse couleur que vous souhaitez *(voir Copie d'écran 16 : Fenêtre « Configuration Control » - Détails – p.33 –Point I et Copie d'écran 23 : Sélection fausse couleur – p.39)*.

Configuration de la Track 2 : « TRITC »

Toujours dans la fenêtre « Configuration Control » :

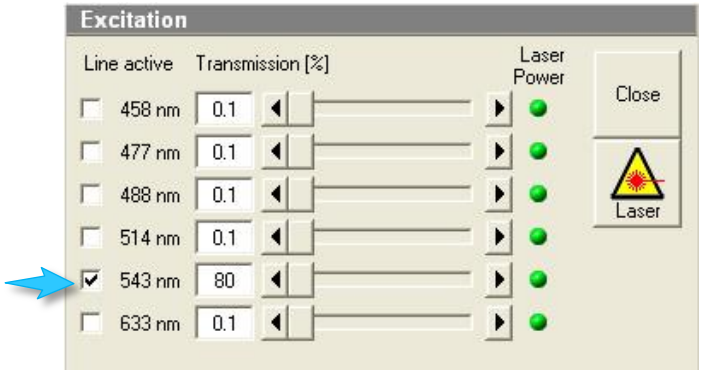
a- Dans zone « List of tracks », cliquez sur la track que vous souhaitez configurer pour la mettre en surbrillance.

b- Cliquez sur l'icône « Excitation »

pour ouvrir les options concernant les lasers.

c- Cochez les lasers à envoyer sur l'échantillon.

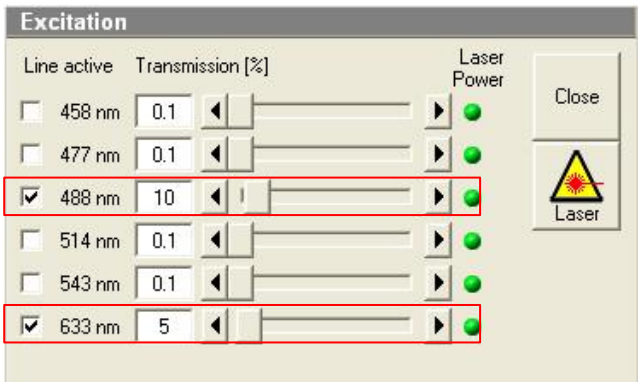
Nous avons vu précédemment que pour exciter le TRITC nous devions utiliser la raie 543 nm. Cochons donc ce laser :



Copie d'écran 24 : Option Excitation – Fenêtre « Configuration Control » - 2

d- Afin de pouvoir exciter efficacement les fluorochromes, ajustez correctement le pourcentage de transmission pour l'ensemble des lasers précédemment cochés.

Le laser HeNe1 – 543 nm fait 1 mW. Pour commencer, vous pouvez régler le pourcentage de transmission autour de 80 % (Vous pouvez évidemment ajuster cette valeur en cas de besoin. Par exemple, si à 80 % votre échantillon bleach très rapidement, pensez à diminuer cette valeur).



△ ***Attention :***

APPUYEZ BIEN SUR LA TOUCHE « ENTER » POUR VALIDER ET ENREGISTER VOTRE VALEUR DE POURCENTAGE DE TRANSMISSION..

Copie d'écran 25 : Réglage pourcentage de transmission lasers - 2

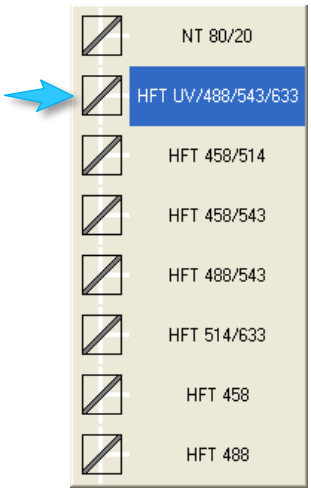
e- Cliquez sur l'icône des miroirs dichroïques principaux et sélectionnez le miroir dichroïque principal (HFT) *(voir Copie d'écran 16 : Fenêtre « Configuration Control » - Détails – p.33 –Point D)* qui vous permettra de réfléchir sur l'échantillon les raies lasers sélectionnées précédemment *(Voir Configuration de la Track 1 : « Alexa 488 + To Pro 3 » - p.35 – Etape e pour plus de détails)*.

A savoir / Notez-bien :

Dans la mesure du possible, mettez en place le même miroir HFT que celui utilisé dans la track 1. Ceci vous fera gagner du temps en évitant un changement de miroir à chaque changement de track.

Dans notre cas, nous devons réfléchir sur l'échantillon 543 nm. Nous avons en track 1 le miroir HFT UV/488/**543**/633

. Ce miroir réfléchit bien 543 nm. Nous utilisons donc aussi ce miroir dans la track 2.



Copie d'écran 26 : Choix du miroir dichroïque principal - 2

La raie laser est donc maintenant réfléchie sur l'échantillon.

f- Vérifiez que la zone des cubes de fluorescence est bien sur « None ». Dans le cas contraire mettez « None » *(voir Copie d'écran 16 : Fenêtre « Configuration Control » - Détails – p.33 –Point E)*.

g- L'échantillon est excité et émet maintenant les longueurs d'ondes d'émission.
Aidez-vous du tableau que vous avez rempli page 29. Regardez les valeurs des pics d'émission de vos fluorochromes.

Fluorochrome(s)	Valeur du Pic d'excitation (nm)	Raie d'excitation (nm)	Valeur du Pic d'émission (nm)
Alexa 488	498 nm	488 nm	520 nm
TRITC	**555 nm**	**543 nm**	**580 nm**
TO-PRO 3	643 nm	633 nm	657 nm

Dans notre cas, le TRITC émet à 580 nm.
Le but est maintenant de détecter cette émission sur un détecteur (PMT-Fluo 1 ou PMT-Fluo 2).
Pour déterminer sur quel détecteur enregistrer cette émission, remettez si possible le même miroir dichroïque secondaire (NFT) que celui utilisé en track 1 et déterminez où vous devez détecter l'émission de fluorescence.

Nous avions en track 1 le NFT 545 nm

. Ce miroir réfléchit jusqu'à 545 nm. Ainsi, l'émission du TRITC (580 nm) passe à travers le miroir. Mettons donc en place ce miroir NFT 545 nm pour éviter un changement de miroir au changement de track et détectons l'émission du TRITC sur le détecteur PMT-FLuo 1.

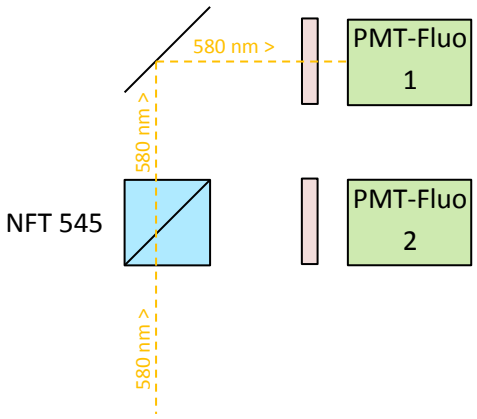


Schéma 3 : Séparation des émissions – Miroirs Dichroïques secondaire NFT

L'émission à 580 nm part vers le détecteur PMT-Fluo 1.

A savoir / Notez-bien :

Dans la mesure du possible, mettez en place le même miroir NFT que celui utilisé dans la track 1. Ceci vous fera gagner du temps en évitant un changement de miroir à chaque changement de track.

h- Cliquez sur l'icône « Filtre d'émission » du PMT-Fluo 1 et sélectionnez le filtre d'émission adéquat *(voir Copie d'écran 16 : Fenêtre « Configuration Control » - Détails – p.33 –Point G)*.
Le filtre d'émission doit vous permettre de laisser passer le pic d'émission du fluorochrome que vous souhaitez détecter. Il doit aussi vous permettre de bloquer la longueur d'onde d'excitation et bloquer l'émission de fluorescence des éventuels autres fluorochromes ayant de plus grandes longueurs d'ondes d'émission.
Plus détails sur les filtres d'émission au paragraphe « Type de filtres » page 38.

Dans notre cas nous souhaitons détecter sur le PMT-Fluo 1 l'émission du TRITC.
Aidez-vous de votre tableau de connaître les valeurs nécessaires au choix du filtre d'émission.

Fluorochrome(s)	Valeur du Pic d'excitation (nm)	Raie d'excitation (nm)	Valeur du Pic d'émission (nm)
Alexa 488	498 nm	488 nm	520 nm
TRITC	**555 nm**	**543 nm**	**580 nm**
TO-PRO 3	643 nm	633 nm	657 nm

Le TRITC a été excité à 543 nm : Nous choisirons donc un filtre capable de bloquer 543 nm.

Le TRITC a un pic d'émission à 580 nm : Nous choisirons donc un filtre capable de laisser passer 580 nm.

Le TRITC n'a pas la plus grande valeur de longueur d'onde d'émission. Il y a un fluorochrome derrière. Nous choisirons donc un filtre Band Pass.

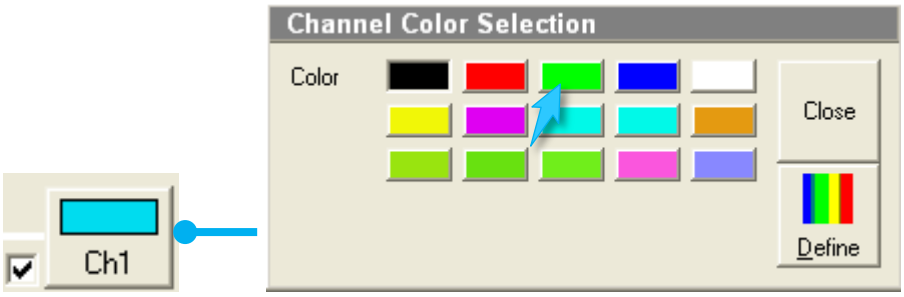
D'après les informations ci-dessus, nous devons donc choisir le filtre BP 560-615

(Ce filtre bloque les longueurs d'ondes avant 560 nm et après 615 nm, mais laisse bien passer le pic d'émission de 580 nm).

i- Cochez la case du détecteur PMT-Fluo 1 (Ch1)

(voir Copie d'écran 16 : Fenêtre « Configuration Control » - Détails – p.33 –Point I).

j- Cliquez sur l'icône « PMT-Fluo 1 » (CH1) puis sélectionnez la fausse couleur que vous souhaitez *(voir Copie d'écran 16 : Fenêtre « Configuration Control » - Détails – p.33 –Point I)*.

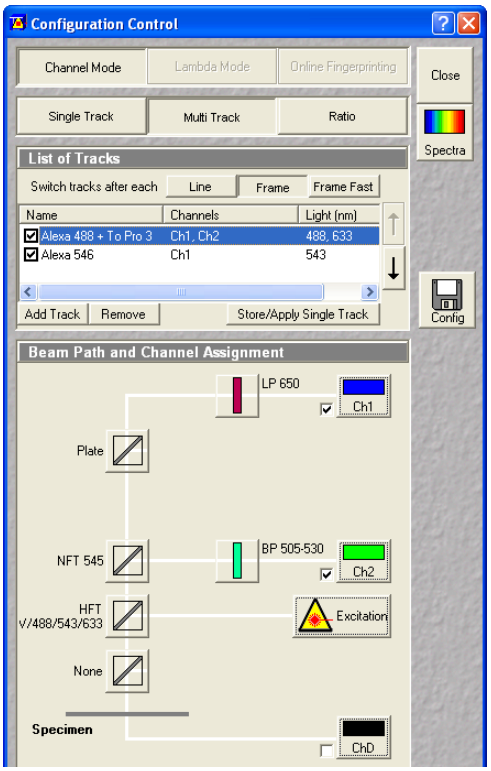


Copie d'écran 27 : Sélection fausse couleur - 2

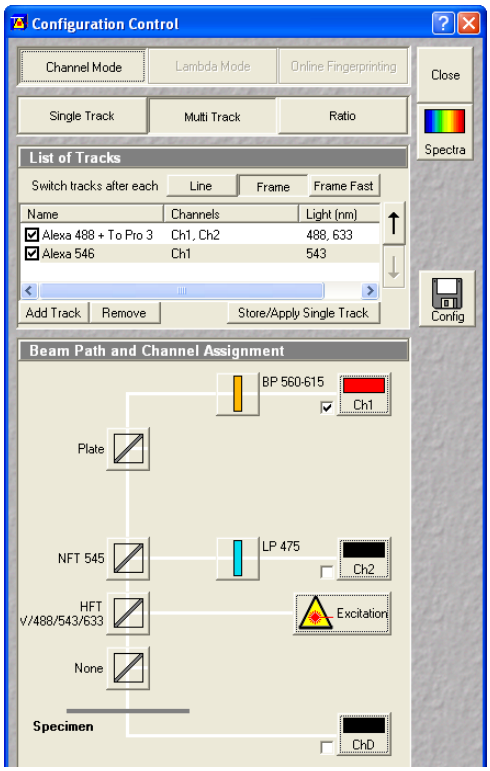
Résumé de la configuration de démo

Acquisition de Alexa 488, TRITC et To-Pro 3 en mode multi tracks avec 2 tracks :

Track 1 : Alexa 488 + To Pro 3

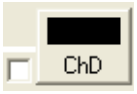


Track 2 : TRITC

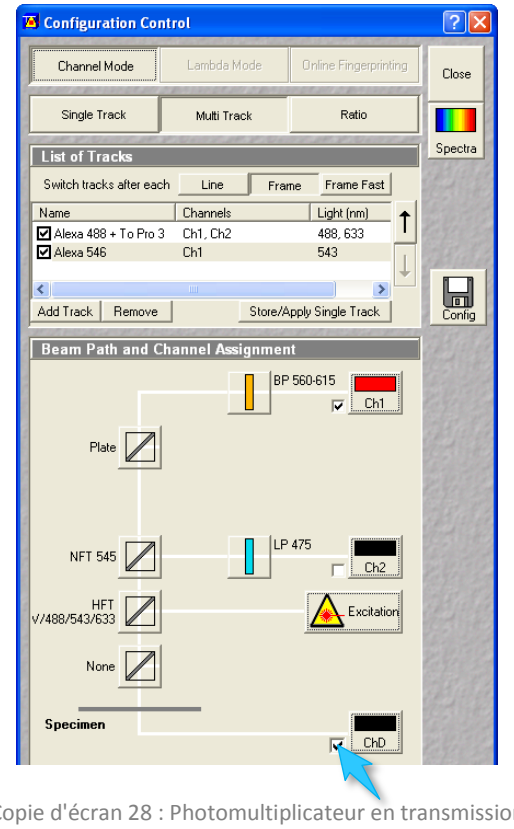


Réalisation d'une acquisition en transmission en mode confocal

Si vous souhaitez acquérir une image de transmission en mode confocal vous pouvez utiliser le photomultiplicateur PMT-Trans.

Pour utiliser le PMT-Trans, cochez simplement, dans une de vos tracks, l'icône ChD 

en bas de la fenêtre « Configuration control » *(voir Copie d'écran 16 : Fenêtre « Configuration Control » - Détails – p.32 –Point K)*.



Copie d'écran 28 : Photomultiplicateur en transmission

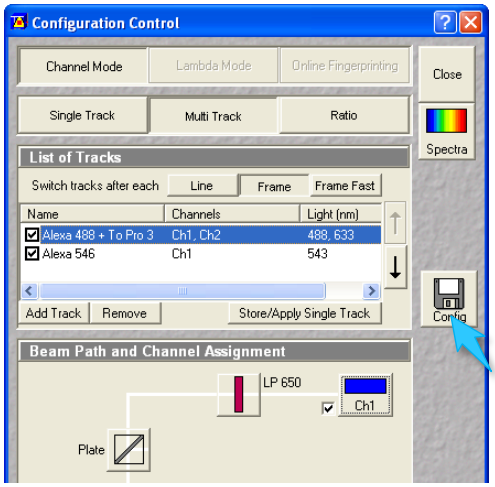
Enregistrement et rappel de configuration

Enregistrement de configuration

Si vous le souhaitez, vous pouvez enregistrer la configuration du trajet optique. Pour cela :

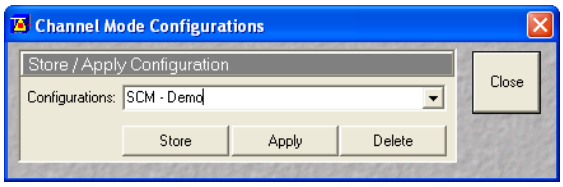
1. Dans la fenêtre « Configuration Control », cliquez sur l'icône « Config »

(voir Copie d'écran 16 : Fenêtre « Configuration Control » - Détails - 33 – Point L).



Copie d'écran 29 : Sauvegarde configuration - 1

2. Nommez votre configuration. Par exemple : « Vos Initiales + Le nom des fluorochromes dans la configuration + l'objectif utilisé ».



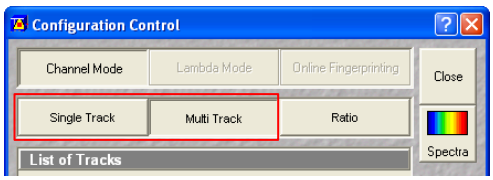
Copie d'écran 30 : Sauvegarde configuration - 2

3. Cliquez sur « Store »

pour enregistrer.

Rappel de configuration

1. Dans la fenêtre « Configuration Control », cliquez sur le mode de confguration que vous souhaitez rappler (Single ou Multi Tracks).

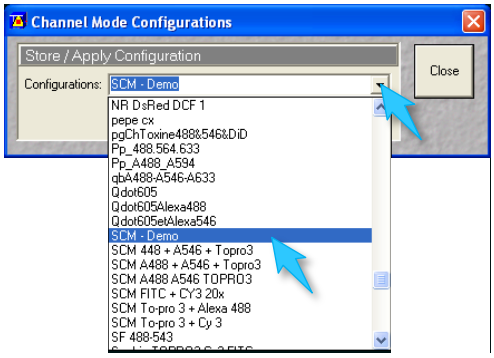


Copie d'écran 31 : Rappel de configuration - 1

2. Cliquez sur l'icône « Config »

(voir Copie d'écran 16 : Fenêtre « Configuration Control » - Détails - 33 – Point L).

3. Cliquez sur le menu déroulant puis sur la configuration de votre choix :



Copie d'écran 32 : Choix d'une configuration enregistrée

4. Cliquez sur « Apply »
.
5. La configuration se recharge alors (Trajet optique + objectif).

⊗ ***ATTENTION / A NE PAS FAIRE :***

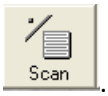
Si vous êtes avec un objectif à immersion et que vous souhaitez recharger une configuration réalisée avec un objectif sec, NETTOYEZ D'ABORD VOTRE LAMELLE AVANT DE RAPPELER LA CONFIGURATION (Voir « Passage d'un objectif à immersion à un objectif sec » – p.75).

La réalisation ainsi que l'enregistrement et le rappel de la configuration confocale sont maintenant terminés. Si vous avez le moindre doute ou si vous rencontrez une difficulté rapprochez-vous immédiatement du Responsable de la Plate-Forme.

Réglage des paramètres d'acquisition

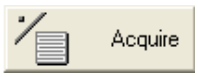
Toutes les valeurs indiquées dans la suite de la procédure sont données à titre indicatif. Elle constitue un bon point de départ pour commencer à faire des observations. Ces valeurs ne sont en aucun cas universelles et ne seront pas forcément adaptées à votre problématique. Les valeurs indiquées ci-après sont des valeurs par défauts. Ne les appliquez pas sans avoir vérifié que ces réglages répondent à vos besoins. Analysez votre question biologique et adaptez les réglages pour répondre le plus efficacement possible à votre problématique.

En cas de doute n'hésitez pas à vous rapprocher du personnel de la Plate-Forme.

Les différents réglages des paramètres d'acquisition sont accessibles dans la fenêtre « Scan Control »* 

.

Pour paramétrer votre acquisition confocale :

1. Cliquez sur l'icône principale « Acquire »* 

puis sur l'icône secondaire « Scan »*

.
La fenêtre « Scan Control » s'ouvre, vous montrant les paramètres de réglage au niveau du scanner et des détecteurs.

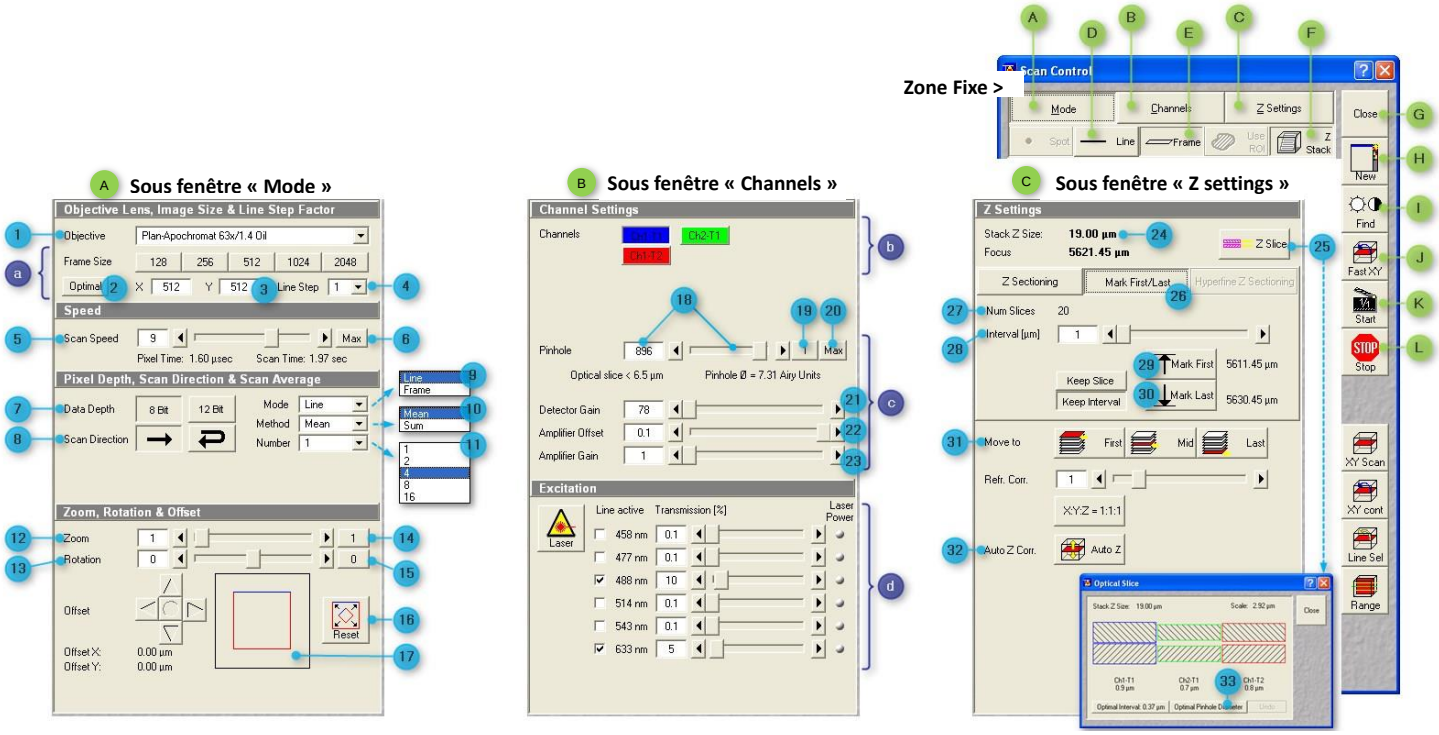
2. Positionnez cette fenêtre correctement comme indiqué au paragraphe « Organisation de l'espace de travail » page 8.

Détail de la fenêtre « Scan control » page suivante.

* *Voir Présentation du software et Tableau 1 : Icônes principales et secondaires – p.3*

La fenêtre « Scan Control »

Ce panneau va vous permettre de régler les paramètres concernant le scanner et les détecteurs du microscope confocal.



Copie d'écran 33 : Fenêtre « Scan Control » - Détails

*Légende **Zone Fixe** :*

- *A- Visualisation de la sous-fenêtre « Mode »*
- *B- Visualisation de la sous-fenêtre « Channels »*
- *C- Visualisation de la sous-fenêtre « Z Settings »*
- *D- Mode acquisition « Line »*
- *E- Mode Acquisition « Frame »*
- *F- Activation / Désactivation du mode « Z Stack »*
- *G- Fermeture de la fenêtre image active*
- *H- Ouverture d'une nouvelle fenêtre image*
- *I- Lancement d'un « Find »*
- *J- Lancement du mode « Fast X/Y »*
- *K- Lancement d'une acquisition*
- *L- Arrêt de l'acquisition*

*Légende **Sous-fenêtre « Mode »** :*

- *1- Visualisation de l'objectif*
- *a- Zone de réglage de la résolution*
- *2- Mise en place de la résolution optimale*
- *3- Réglage manuel de la résolution*
- *4- Réglage du saut de ligne(s)*
- *5- Réglage de la vitesse du scanner*
- *6- Mise en place de la vitesse maximale du scanner*
- *7- Réglage de la dynamique du capteur*
- *8- Réglage de la direction du scanner*
- *9- Réglage du mode de répétition*
- *10- Réglage de la méthode de répétition*
- *11- Réglage du nombre de répétition*
- *12- Réglage du zoom (crop)*
- *13- Réglage de l'angle de rotation*
- *14- Réinitialisation du zoom*
- *15- Réinitialisation de la rotation*
- *16- Réinitialisation du zoom et de la rotation*
- *17- Prévisualisation du zoom et de la rotation*

*Légende **Sous-fenêtre «Channels »** :*

- *b- Choix de la channel*
- *c- Réglage de la channel sélectionnée en A*
- *18- Réglage manuel de la taille du pinhole*
- *19- Réglage automatique du pinhole sur 1 A.U.*
- *20- Réglage automatique du pinhole sur la valeur maximale*
- *21- Réglage du Detector Gain*
- *22- Réglage de de l'Offset*
- *23- Réglage de l'Amplifier Gain*
- *d- Ajustement des lasers pour la channel sélectionnée en b*

*Légende **Sous-fenêtre « Z settings»** :*

- *24- Epaisseur totale du stack*
- *25- Ouverture de la fenêtre « Optical Slice »*
- *26- Ouverture de l'option de réglage « Mark First/Last »*
- *27- Nombre total de slices dans le stack*
- *28- Taille de l'intervalle entre chaque image*
- *29- Enregistrement de la position haute du stack*
- *30- Enregistrement de la position basse du stack*
- *31- Déplacement automatique dans le stack (en haut, milieu et bas)*
- *32- Ouverture de la fenêtre « Auto Z correction »*
- *33- Mise en place du diamètre de pinhole optimal*

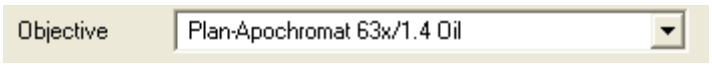
3. Cliquez et activez l'icône « Z Stack »

(Voir Zone F*) si vous souhaitez faire l'acquisition de Z stacks.

4. Cliquez sur l'icône « Mode »

(Voir Zone A*) pour ouvrir la sous-fenêtre « Mode ».

5. Vérifiez que l'objectif indiqué en zone 1* est bien celui que vous souhaitez utiliser pour faire vos images.



Copie d'écran 34 : Vérification objectif - Panneau « Scan Control » / Sous-fenêtre « Mode »

Attention :

Vérifiez bien l'objectif. De nombreux paramètres que vous allez régler dans la suite de la procédure dépendent directement de l'objectif utilisé.

Dans notre exemple nous avons bien l'objectif 63x/1.4 Oil.

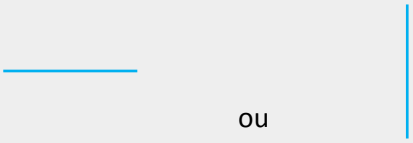
6. Dans la zone fixe, cliquez sur l'icône « Frame »

(Voir Zone E*).

Plus précisément :

Les icônes « Line » et « Frame » :

Permettent de définir un mode de scan.
Frame permet de scanner en x et y, donc d'acquérir selon une forme carrée ou rectangulaire.
Line permet de scanner sur une ligne uniquement. L'image recueillie est donc une simple ligne.

Frame	Line
Ou	 ou

Dans notre exemple nous choisissons « Frame ».

7. Cliquez sur l'icône 2*

pour définir la résolution optimale dans la zone 3*

. Vous voyez maintenant en zone 3* le nombre de points à faire en x et en y pour récupérer toute l'information qu'est capable de délivrer l'objectif.

Dans notre exemple nous avons : 1512 x 1512 pixels.

* *Voir Copie d'écran 33 : Fenêtre « Scan Control » - Détails – p.48*

8. Si votre problématique exige de récupérer toute l'information (par exemple sur une problématique de colocalisation protéine-protéine) ne modifiez pas la résolution optimale définie à l'étape 7.

Si votre problématique ne nécessite pas de récupérer toute l'information en x/y, vous pouvez adapter la résolution en zone 3 *. Vous pourrez ainsi gagner du temps lors de l'acquisition.
La valeur de résolution par défaut est 512 x 512. Entrez cette valeur manuellement puis appuyez sur « Enter » après chaque saisie ou sélectionnez des résolutions raccourcies en cliquant sur l'icône suivante : 128 | 256 | 512 | 1024 | 2048 (voir zone a *). La valeur 512 x 512 est un bon compromis entre le temps d'acquisition et la quantité d'information recueillie.

Dans notre exemple nous choisissons : 512 x 512.

⚠ ***Attention :***

Souvenez-vous que toutes les valeurs de résolution en dessous de la résolution optimale ne vous permettent pas de récupérer toute l'information donnée par l'objectif.
Définissez une valeur de résolution inférieure à la résolution optimale **uniquement** si votre problématique vous le permet.

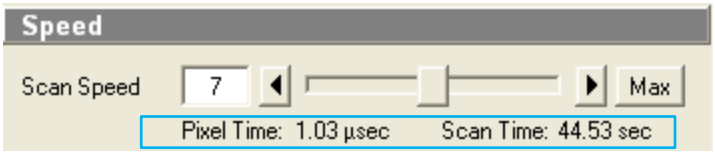
9. Dans la zone 4 *, mettez le « Line Step » sur 1.

10. Dans la zone 5 * (« Scan Speed ») réglez la vitesse entre 6 et 7.

👁 ***Plus précisément :***

Cette zone permet de définir la vitesse du scanner. Plus la valeur est faible plus le scanner est lent.
Plus la vitesse est lente, plus l'image sera de qualité (les vitesses lentes permettent d'améliorer le rapport signal/bruit). Mais attention, plus la vitesse est lente, plus le temps d'acquisition s'allonge. Il faut donc comme pour les autres paramètres trouver le bon compromis.

Dans notre exemple nous choisissons : 7.



Copie d'écran 35 : Zone « Speed » - Panneau « Scan Control »

Le bas de la zone « Speed » indique le temps passé par pixel (Pixel Time) et le temps passé pour un scan complet (Scan time) incluant toutes les tracks *(voir Copie d'écran 35 : Zone « Speed » - Panneau « Scan Control – Cadre bleu)*.

11. Dans la zone 7 * mettez la dynamique du capteur (« Bit Depth ») sur 8 bit 8 Bit.

* *Voir Copie d'écran 33 : Fenêtre « Scan Control » - Détails – p.48*

Plus précisément :

8 bit = 2^8 = 256 niveaux de gris
12 bit = 2^{12} = 4096 niveaux de gris

Adaptez ce réglage en fonction de votre problématique. Sachez que 8 bit permet déjà de répondre à beaucoup de problématiques.

Dans notre exemple nous choisissons « 8 bit».

12. Dans la zone **8** *, choisissez la direction de scan :

= Aller simple (le plus précis).

= Aller-Retour (le plus rapide).

Par défaut vous choisissez « Aller Simple » . L'aller-retour dégrade la qualité de l'image
Choisissez « Aller-Retour » seulement si votre problématique exige une grande rapidité d'acquisition.

Dans notre exemple nous choisissons donc « Aller Simple » .

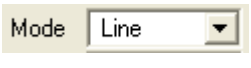
13. Dans la zone **9** *, choisissez le mode : « Line » ou « Frame ».

Plus précisément :

Si la méthode choisie en zone **10** * est « Mean » (voir étape 14) et que le nombre d'itérations en zone **11** * est « 4 » (voir étape 15) :

Line : Le scanner fera 4 fois l'acquisition de la 1ère ligne puis fera la moyenne sur ces 4 lignes. Le scanner passe ensuite à la 2ème ligne, fait 4 fois l'acquisition de la 2ème ligne puis fera la moyenne sur ces 4 lignes…

Frame : Le scanner fait une 1ère fois toute l'image puis une 2ème fois, une 3ème et une 4ème puis fait la moyenne sur les images.

Par défaut, vous pouvez choisir le mode « Line » 

.

Dans notre exemple nous choisissons « Line ».

14. Dans la zone **10** * mettez la méthode sur « Mean »

.

* *Voir Copie d'écran 33 : Fenêtre « Scan Control » - Détails – p.48*

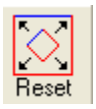
15. Dans la zone 11 * définissez le nombre d'itérations pour la méthode sélectionnée en zone 10 *.
Par défaut vous pouvez régler ce paramètre sur 2 ou 4.

Plus précisément :

Si la méthode choisie en 10 * est « Mean », plus vous mettez d'itérations en 11 * plus vous améliorez le rapport signal/bruit mais plus vous allongez le temps d'acquisition.

Dans notre exemple nous choisissons « 4 ».

16. Dans la zone 12 * (« Zoom ») vous pouvez définir une taille de zoom précis.

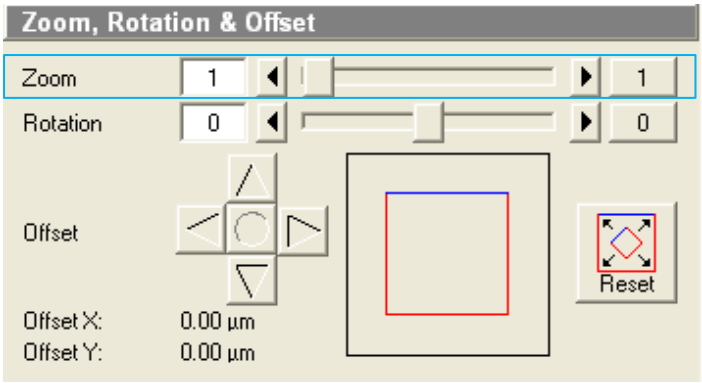
Pour réinitialiser le zoom et la rotation, cliquez sur l'icône 16 * « Reset » 

(taille d'image standard).

Vérifiez que la valeur de zoom soit bien « 1 ». Sinon, cliquez sur « 1 »

pour obtenir une taille d'image standard.

Dans notre exemple nous avons bien une taille de zoom égale à 1. On ne touche donc à rien.



Copie d'écran 36 : Zone Zoom – Fenêtre « Scan Control » - Sous fenêtre « Mode »

Attention :

Si des modifications ont été apportées à cette zone (« Zoom ») ou si vous avez cliqué sur « Reset All », il faut redéfinir la résolution à l'étape 7 et 8.

17. Cliquez sur l'icône « Channels »

(Voir Zone B *) pour ouvrir la sous-fenêtre « Channels ».

* *Voir Copie d'écran 33 : Fenêtre « Scan Control » - Détails – p.48*

La zone b * permet de sélectionner une track pour ajuster ses paramètres.

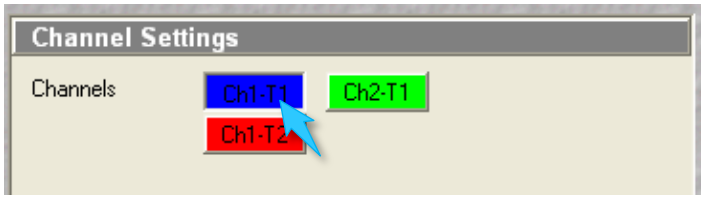
La zone c * permet d'ajuster les paramètres de la track sélectionnée en b *.

Pour chacune des tracks, il y aura 3 éléments à régler en zone c * :

- La taille du pinhole.
- La valeur de « Detector Gain ».
- La valeur de l' « Amplifier Offset ».

Les valeurs données dans la suite de la procédure se rapportent à l'échantillon. Suivez la méthode décrite ci-après et adaptez les réglages selon vos besoins.

18. Sélectionnez la 1ère track. Cliquez simplement sur la track de votre choix dans la zone b *. La zone c * se met alors à jour et vous montre les paramètres concernant la track sélectionnée.



Copie d'écran 37 : Sélection Track – Sous fenêtre "Channels"

19. **Pour toutes les tracks présentes dans la zone b *, sélectionnez les tracks une à une puis** cliquez sur l'icône 19 * « 1 » 1 pour définir la taille du pinhole à 1 AU.

Copie d'écran 38 : Sélection 1AU - Panneau "Channels"

Répétez cette étape pour toutes les tracks de votre configuration.

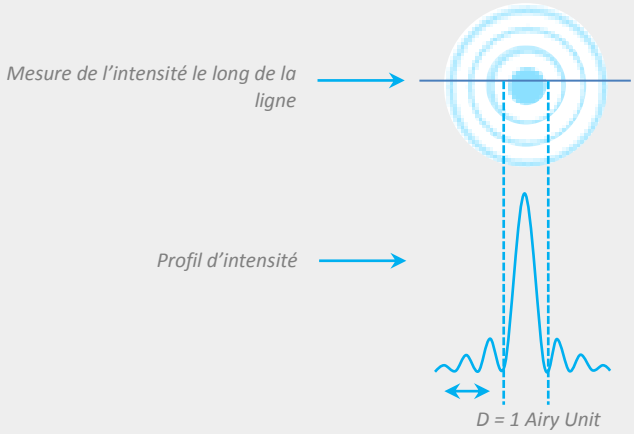
Plus précisément :

L'unité d'Airy est basée sur les disques d'Airy. Ces disques sont en fait la figure de diffraction d'un point (voir illustration ci-dessous).

Schéma 4 : Figure de diffraction d'un point

* *Voir Copie d'écran 33 : Fenêtre « Scan Control » - Détails – p.48*

Si l'on mesure l'intensité le long de la ligne tracée ci-dessous on obtient le profil d'intensité suivant :



La distance D du 1er pic d'intensité correspond à 1 Airy Unit (1 AU). La largeur de ce premier pic varie en fonction de la longueur d'onde d'émission du fluorochrome et de l'ouverture numérique de l'objectif utilisé.

La formule est : $D\ (en\ nm) = 2 \times \left(\frac{0{,}61 \times Longueur\ d'onde\ (en\ nm)}{Ouverture\ numérique\ de\ l'objectif}\right)$

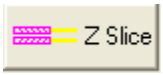
Donc plus la longueur d'onde est grande plus la largeur du 1er pic est grande.

Pour être confocal, le pinhole doit avoir une taille comprise entre 0,8 et 1 AU.
Un pinhole trop grand ne vous donnerait plus une image confocale. Un phinhole trop petit ne permettrait plus de recueillir suffisamment de signal.

20. Pour ajuster l'acquisition confocale en z, cliquez maintenant sur l'icône C* « Z settings »

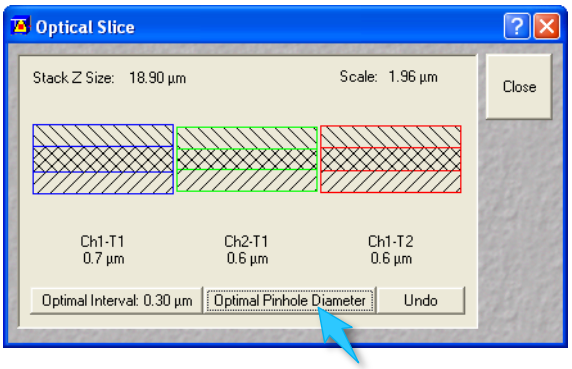
puis sur l'icône 26*

« Mark First/Last ».

21. Cliquez sur l'icône 25* « Z Slice » 

pour ouvrir le panneau « Optical slice » puis cliquez sur l'icône 33* « Optimal Pinhole Diameter »

.



Copie d'écran 39 : Panneau « Optical Slice »

Les pinholes s'ajustent pour qu'il y ait 50% de recouvrement entre la tranche n et la tranche n+1.

* *Voir Copie d'écran 33 : Fenêtre « Scan Control » - Détails – p.48*

22. Retournez dans la sous fenêtre « Channels » (voir étape 17) puis vérifiez la taille des pinholes dans chacune des tracks.

Si un ou plusieurs phinholes sont trop petits (< à 0,8 A.U.) c'est que votre intervalle en « z » entre chaque image est trop petit. Au contraire si un ou plusieurs pinholes sont trop grand (> à 1 A.U.) c'est que votre intervalle en « z » entre chaque image est trop grand.

23. Retournez dans la sous fenêtre « Z settings »

et ajustez l'intervalle en « z » au niveau de la zone **28*** selon les indications de l'étape 22 (Augmentez les intervalles si les pinholes sont trop petits ou diminuez les intervalles si les pinholes sont trop grands).

24. Dans le panneau « Optical Slice » cliquez à nouveau sur « Optimal Pinhole Diameter » pour ajuster les pinholes (voir étape 21).

Répétez les étapes 22, 23 et 24 jusqu'à ce que tous les pinholes aient une valeur correcte.

Il reste maintenant 2 paramètres à ajuster : l' « Detector Gain » et l' « Amplifier Offset ».

Plus précisément :

A l'*étape 11*, nous avons réglé la dynamique du capteur sur 8 bit. Cela signifie que les images que nous alons acquérir seront composées de pixels qui auront des valeurs comprises entre 0 et 255 (soit 256 niveaux de gris).

Le « Detector Gain » permettra d'amplifier le signal au niveau du photomultiplicateur pour exploiter toute la dynamique du capteur. C'est-à-dire, amplifier le signal jusqu'à ce que le pixel le plus intense ait la valeur 255 (ce pixel sera alors à la saturation).

Le « Amplifier Offset » permettra de retirer de l'image finale les pixels de faibles intensités (l' « Amplifier Offset » retire les pixels de 0 à la valeur d'intensité de votre choix). Ceci permet de supprimer le background. Attention : Un « Amplifier Offset » trop fort supprimera de fortes intensités qui correspondent peut être à votre signal. Assurez-vous que l' « Amplifier Offset » ne risque pas de supprimer votre signal d'intrêt.

25. Vérifiez votre focus *(voir Réalisation de la mise au point – p.26)* :
- ↳ Cliquez sur l'icône « VIS ».
- ↳ Ouvrez le shutter de la fluorescence.
- ↳ Choisissez un cube de fluorescence.
- ↳ Ajustez la mise au point si besoin.
- ↳ Fermez le shutter de la fluorescence.

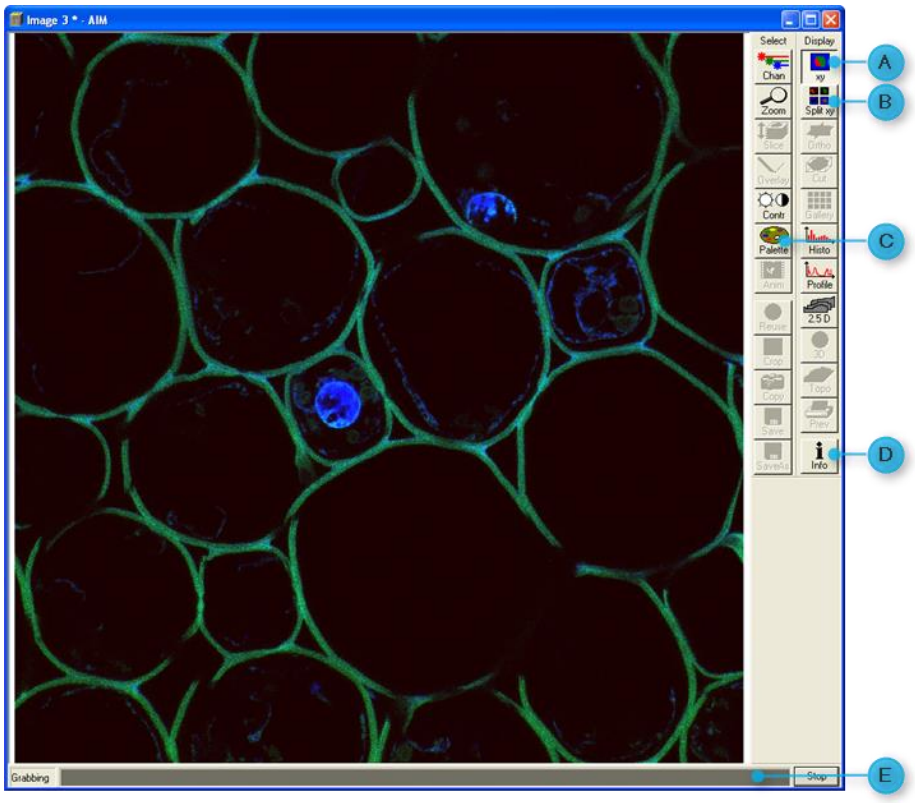
Attention :

A partir de maintenant, le microscope va utiliser les lasers. Ne prénétrez jamais vos mains ou un objet dans la zone délimitée par la platine.

26. Dans la sous fenêtre « Channels », sélectionnez une channel puis cliquez sur l'icône I * « Find » Find.

Le logiciel fait différents essais de « Detector Gain » et d' « Amplifier Offset » jusqu'à trouver du signal sur l'image. Vous pouvez réappuyer sur l'icône « Find » si la tentative a échouée.

Le logiciel affiche maintenant dans la fenêtre « Image » *(voir Copie d'écran 40 : Fenêtre « Image – p. 56)* une image de l'échantillon.



Copie d'écran 40 : Fenêtre « Image »

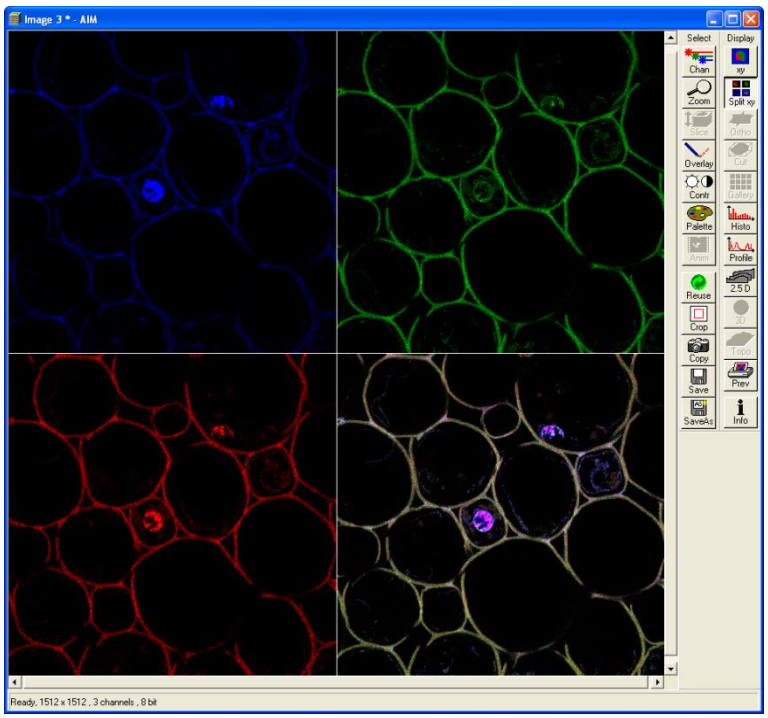
Légende :

A- Affichage 2D = Merge
B- Affichage Split = Visualisation des canaux séparément + merge
C- Ouverture du panneau palette
D- Informations concernant l'image
E- Barre d'activité

27. Sélectionnez les autres « channels » une à une puis répétez l'étape 26.

28. Cliquez sur l'icône **B** *(voir Copie d'écran 40 : Fenêtre « Image – ci-dessus)* pour spliter l'image.

* *Voir Copie d'écran 33 : Fenêtre « Scan Control » - Détails – p.48*



Copie d'écran 41 : Fenêtre « Image » - Image Splitée

Il faut maintenant affiner le réglage de « Detector Gain » et de l'« Amplifier Offset ». Pour cela il faut un retour visuel en live de l'image. L'image live se met à jour en boucle. En jouant sur un paramètre on voit donc directement comment cela agit sur l'image.

29. Cliquez sur l'icône J * « Fast X/Y»

.
L'acquisition de l'image se fait maintenant en boucle avec des paramètres d'acquisitions accélérés qui permettent d'avoir un rafraichissement de la vue assez rapide.

A savoir / Notez-bien :

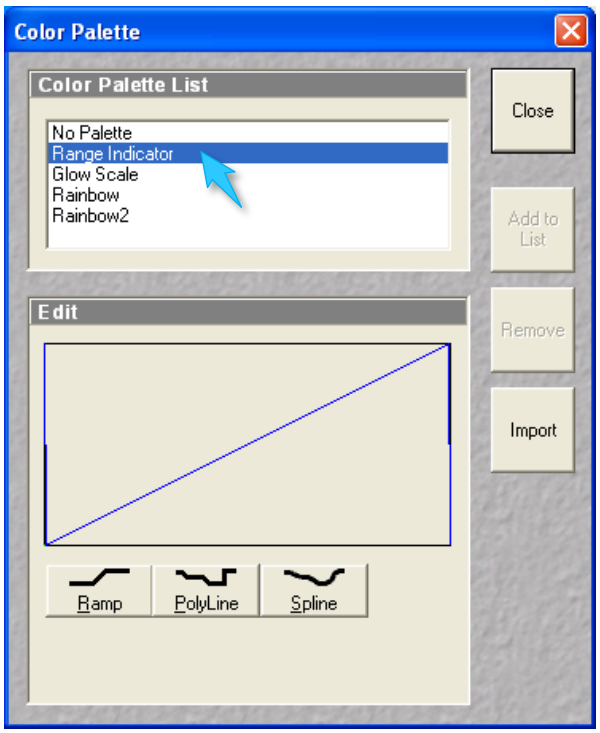
Si vous souhaitez faire une observation en boucle de l'image avec vos paramètres d'acquisitions, cliquez sur « XY Cont »

(voir Copie d'écran 33 : Fenêtre « Scan Control » - Détails – p.48 – Zone Fixe). Tous vos paramètres seront pris en compte pour réaliser la vue en boucle (Attention : le rafraichissement de l'image peut être plus lent qu'en « Live »).

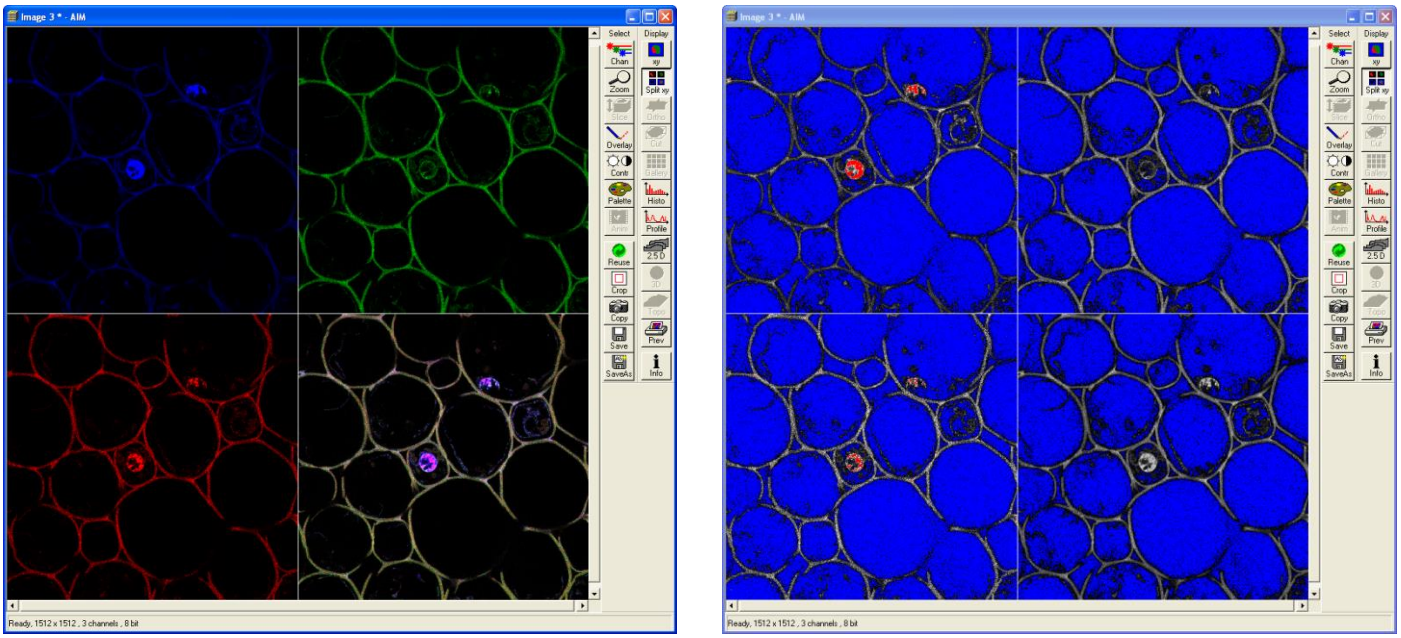
30. Dans la fenêtre « Image », cliquez sur l'icône **C** **

« Palette » pour ouvrir le panneau « Color Palette » puis sélectionnez « Range Indicator ».

* *Voir Copie d'écran 33 : Fenêtre « Scan Control » - Détails – p.48*
** *voir Copie d'écran 40 : Fenêtre « Image » - p.56*



Copie d'écran 42 : Panneau « Color Palette »



↑ *Range indicator désactivé*

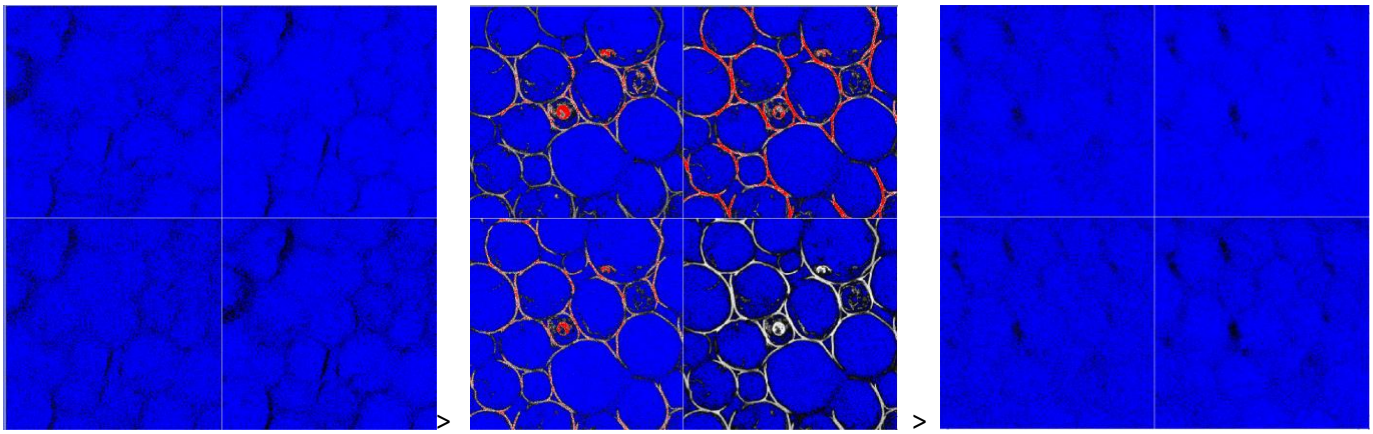
↑ *Range indicator activé*

Copie d'écran 43 : Range Indicator

Une fois le « Range Indicator » activé, vous voyez en bleu les pixels dans l'offset (considérés comme nuls sur l'image finale) et en rouge les pixels à saturation.

31. Balayez en z toute l'épaisseur de l'échantillon grâce à la vis micrométrique droite du statif (vis la plus à l'extérieur) *(voir Photo(s) 6 : Vues statif - 16 – Point 2)* et recherchez la position en z la plus saturée.

Tout en haut de l'échantillon **Position en z la plus saturée** **Tout en bas de l'échantillon**



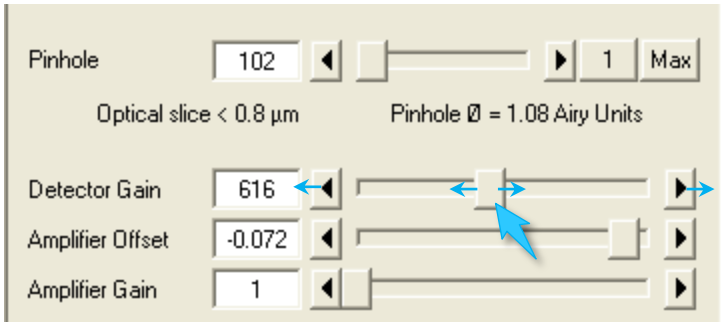
Copie d'écran 44 : Recherche du Z le plus intense

> ***Attention :***
>
> Tournez très délicatement la vis micrométrique dans un sens ou dans l'autre. Laissez le temps au microscope et au logiciel de rafraichir l'image.

32. Après avoir trouvé la position en z la plus saturée, ajustez la valeur de « Detector Gain » pour chacune des channels. Le but est d'exploiter au mieux la dynamique du détecteur. Il faut donc avoir uniquement quelques pixels rouges dans chaque channel.

Pour toutes les tracks présentes dans la zone b * **du panneau « Channels », sélectionnez les tracks une à une puis :**

↳ Dans la zone 21 * du panneau « Channels » diminuez ou augmentez la valeur du « Detector Gain » de façon à obtenir uniquement quelques pixels rouges pour chaque channel.



Copie d'écran 45 : Réglage « Detector Gain »

Vous avez 2 solutions pour ajuster le « Gain (Master) » :

- Utilisez les flèches gauche et droite (ajustement précis).
- Cliquez et maintenez le curseur puis faites le glisser à gauche (diminution du gain) ou à droite (augmentation du gain).

* *Voir Copie d'écran 33 : Fenêtre « Scan Control » - Détails – p.48*

⊗ ***ATTENTION / A NE PAS FAIRE :***

Ne modifiez pas les valeurs du « Detector Gain » brusquement. Modifiez les valeurs de manière progressive.

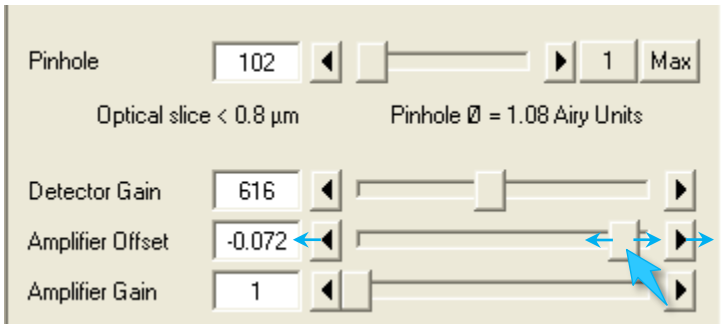
↳ Pour chacune des tracks efforcez-vous d'obtenir des valeurs de « Detector Gain » comprises entre 400 et 800 (zone linéaire du gain).

S'il vous faut mettre un gain très supérieur à 800 pour arriver à la saturation, vous pouvez augmenter le pourcentage de transmission du laser correspondant à la channel (évitez toujours de dépasser 10% - Zone d * du sous panneau « Channels »). L'augmentation du pourcentage de transmission vous permettra de diminuer la valeur de gain.

A l'inverse, s'il vous faut mettre un gain inférieur à 400 pour n'avoir que quelques pixels rouges, vous pouvez diminuer le pourcentage de transmission du laser correspondant à la channel - Zone d * du sous panneau « Channels »). La diminution du pourcentage de transmission vous permettra d'augmenter la valeur de gain.

33. Pour toutes les tracks présentes dans la zone b * du panneau « Channels », sélectionnez les tracks une à une puis :

↳ Dans la zone 22 * du sous-panneau « Channels » ajustez la valeur de l'« Amplifier Offset » si besoin.



Copie d'écran 46 : Ajustement "Digital Offset"

Vous avez 2 solutions pour ajuster le « Amplifier Offset » :

- Utilisez les flèches gauche et droite (ajustement précis).
- Cliquez et maintenez le curseur puis faites le glisser à gauche (Augmentation de l'offset) ou à droite (Diminution de l'offset).

Vous pouvez ajuster cette valeur si vous le souhaitez mais veuillez toujours à ne pas mettre trop d'offset au risque de perdre votre signal d'intérêt.

* *Voir Copie d'écran 33 : Fenêtre « Scan Control » - Détails – p.48*

33. Stoppez le live en cliquant sur l'icône L* « Stop »

.

Le réglage des paramètres d'acquisition est maintenant terminé. Si vous avez le moindre doute ou si vous rencontrez une difficulté rapprochez-vous immédiatement du Responsable de la Plate-Forme.

Acquisition et enregistrement d'images

Acquisition d'images simples (uniquement le plan focal)

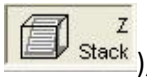
L'acquisition d'images simples permet d'acquérir uniquement l'information provenant du plan focal actuellement visible sur le microscope. Pour acquérir ce type d'images, suivez la procédure suivante :

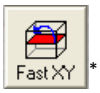
ATTENTION : Toutes les opérations d'installation de l'échantillon, de mise au point, de configuration du trajet optique confocal et de réglages des paramètres d'acquisition *(voir : Installation de l'échantillon p.18, Réalisation de la mise au point p.26, Réalisation de la configuration confocale p.28 et Réglage des paramètres d'acquisition p.47)* doivent avoir été réalisées avant de suivre la procédure suivante.

Procédure :

1. Vérifiez que l'icône « Z Stack »*

est inactive (icône non enclenchée :

). Si cette icône est active (icône enclenchée : 

), cliquez dessus une fois pour la désactiver.
2. Cliquez sur l'icône « Fast X/Y» 

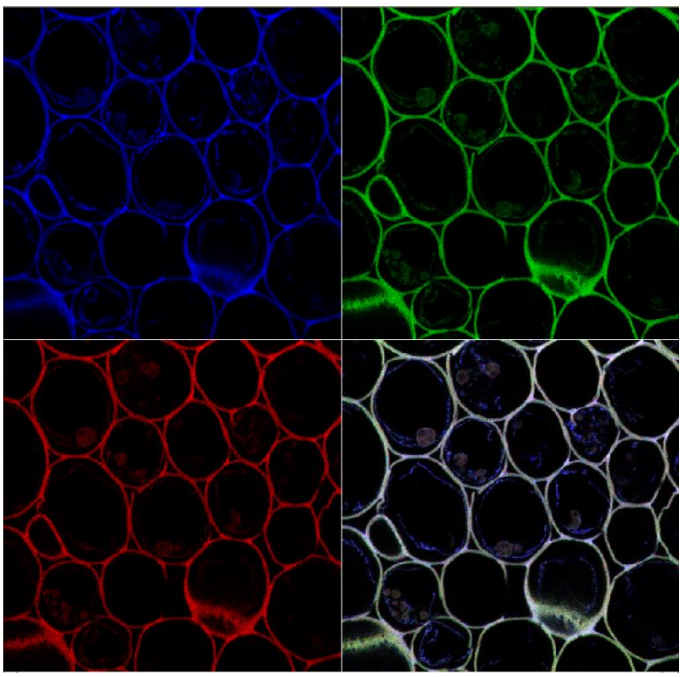
*.
3. Choisissez le plan focal que vous souhaitez imager en balayant en z votre échantillon grâce à une vis micrométrique (vis la plus à l'extérieur) du statif *(voir Photo(s) 6 : Vues statif - 16 – Point 2)*. Arrêtez-vous sur le plan focal de votre choix.
4. Stoppez le live en cliquant sur l'icône « Stop »

*.
5. Cliquez sur l'icône K *« Single »

(l'icône « Start » se transforme en « Single » quand l'option « Z Stack » est désactivée) pour faire l'acquisition de votre image au plan focal avec vos paramètres.

L'acquisition de l'image démarre.

* *Voir Copie d'écran 33 : Fenêtre « Scan Control » - Détails – p.48*



Copie d'écran 47 : Image simple acquise

Pendant l'acquisition, la barre d'activité (en bas de la fenêtre « Image » - *voir Copie d'écran 48 : Barre de progression (1) – ci-dessous*) affiche une barre de progression. Cette barre vous indique l'avancement de l'acquisition.

Copie d'écran 48 : Barre de progression (1)

6. La barre de progression disparaît quand elle arrive à 100%. L'acquisition est alors terminée. Votre image reste affichée dans la zone « Image ».

7. Avant de faire quoi que ce soit d'autre, enregistrez votre image *(Voir Enregistrement des images – p.66)*.

Acquisition de Z-stacks (piles d'images en z)

L'acquisition de Z-stacks vous permet de recueillir toute l'information en Z de votre échantillon. Pour acquérir ce type d'images, suivez la procédure suivante :

ATTENTION : Toutes les opérations d'installation de l'échantillon, de mise au point, de configuration du trajet optique confocal et de réglages des paramètres d'acquisition *(voir : Installation de l'échantillon p.18, Réalisation de la mise au point p.26, Réalisation de la configuration confocale p.28 et Réglage des paramètres d'acquisition p.47)* doivent avoir été réalisées avant de suivre la procédure suivante.

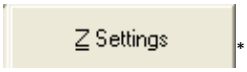
Procédure :

1. Vérifiez que l'icône « Z Stack »*

est active (icône enclenchée :

). Si cette icône est inactive (icône désenclenchée :

), cliquez dessus une fois pour l'activer.

2. Cliquez sur l'icône « Z Settings » 

*.

3. Cliquez sur l'icône « Fast X/Y »

*.

Vous devez maintenant définir le haut et le bas de votre échantillon.

4. Balayez votre échantillon en z votre grâce à une vis micrométrique (vis la plus à l'extérieur) du statif *(voir Photo(s) 6 : Vues statif - 16 – Point 2)*. Arrêtez-vous à l'extrémité en z de votre choix.

5. Cliquez sur « Mark First »

- Icône 29*, pour mémoriser cette extrémité.

6. Balayez en z votre échantillon dans l'autre sens grâce à une vis micrométrique (vis la plus à l'extérieur) du statif *(voir Photo(s) 6 : Vues statif - 16 – Point 2)*. Arrêtez-vous à l'extrémité en z de votre choix.

7. Cliquez sur « Mark Last »

- Icône 30*, pour mémoriser cette autre extrémité.

Les bornes haute et basse de votre échantillon sont maintenant enregistrées.

8. Pour démarrer l'acquisition du stack, cliquez maintenant sur l'icône K* « Start »

.

   L'acquisition du Z-stack démarre.

* *Voir Copie d'écran 33 : Fenêtre « Scan Control » - Détails – p.48*

Pendant l'acquisition, la barre d'activité (en bas de la fenêtre « Image » - *voir Copie d'écran 49 : Barre de progression - Z-Stack - ci-dessous*) affiche une barre de progression. Cette barre vous indique l'avancement de l'acquisition. Le temps restant et le temps total sont aussi indiqués (Format d'affichage du temps 00 : 00 : 00 = Heures : Minutes : Secondes).

Copie d'écran 49 : Barre de progression - Z-Stack

9. La barre de progression disparaît quand elle arrive à 100%. L'acquisition est alors terminée. Votre image est affichée dans la zone « image ».

10. Avant de faire quoi que ce soit d'autre, enregistrez votre image *(Voir Enregistrement des images – p.58)*.

L'acquisition des images est maintenant terminée. Si vous avez le moindre doute ou si vous rencontrez une difficulté rapprochez-vous immédiatement du Responsable de la Plate-Forme.

Enregistrement des images

A la fin d'une acquisition, l'image reste ouverte mais n'est en aucun cas sauvegardée. Pensez donc à enregistrer vos images directement après chaque acquisition.

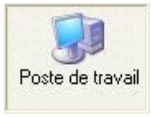
Pour enregistrer des images, le logiciel LSM 510 fonctionne sur le principe de la base de données. Vous devez donc avant d'enregistrer votre 1ère image, créer une base de données.

Création et ouverture d'une base de données

Pour créer votre base de données :

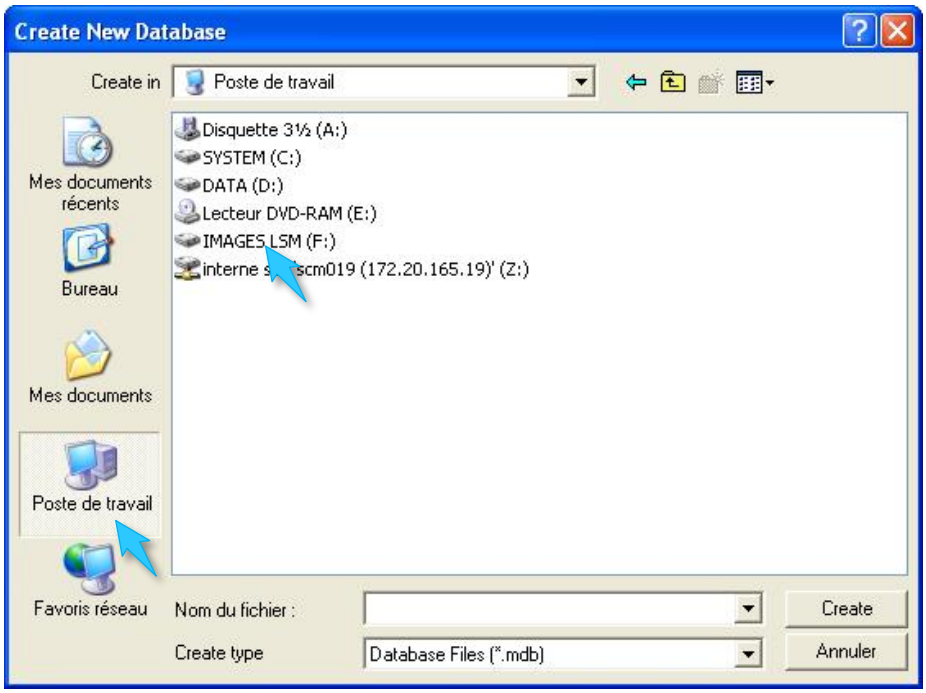
1. Cliquez sur l'icône « Files »

*dans la barre d'icônes principales puis sur « New »

*.
2. Dans la fenêtre « Create New Database » qui s'ouvre, cliquez sur « Poste de travail » 

puis double-cliquez sur le disque de stockage local dédié à l'enregistrement de vos fichiers

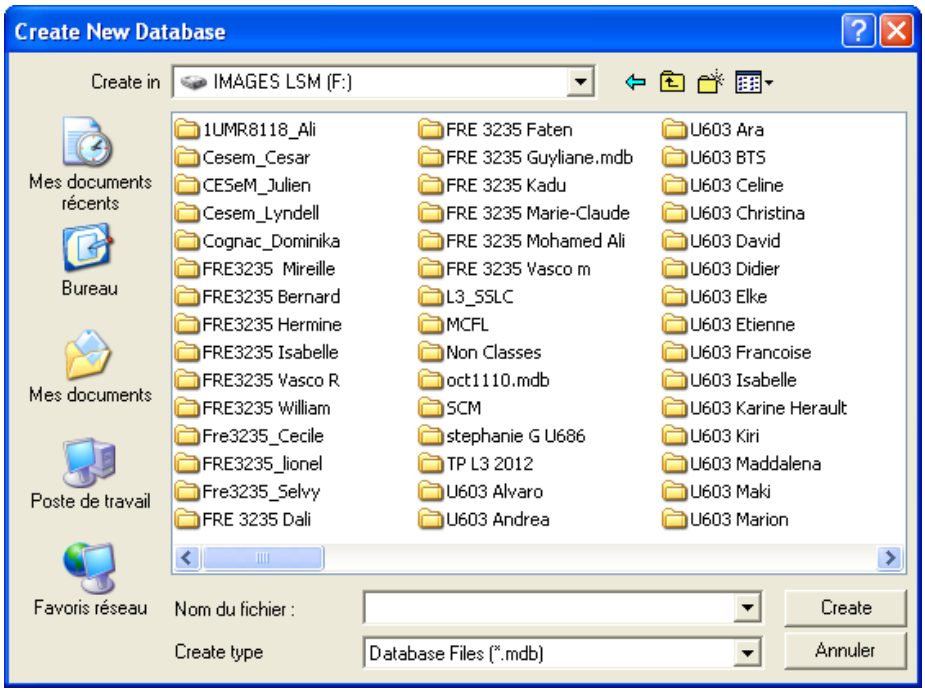
(sur ce poste : F : Images LSM)



Copie d'écran 50 : Fenêtre « Create New Database »

* *Présentation du software – p.3*

3. Le disque F : s'ouvre.



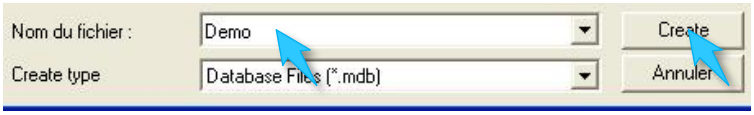
Copie d'écran 51 : Contenu du disque de stockage local

4. Double-cliquez sur votre dossier personnel.

⊗ ***ATTENTION / A NE PAS FAIRE :***

N'ENREGISTREZ JAMAIS VOS IMAGES DIRECTEMENT SUR LE SERVEUR DE STOCKAGE « SCMRAID ». PENDANT LA SESSION, ENREGISTREZ TOUJOURS VOS IMAGES SUR LE DISQUE DUR LOCAL A L'ADRESSE INDIQUEE SUR L'ETIQUETTE JAUNE COLLEE SUR L'ECRAN DE L'ORDINATEUR.

5. Dans votre dossier personnel local, **NE CREEZ-PAS** de nouveau sous-dossier.
Mettez juste le nom que vous souhaitez donner à la base de données pour enregistrer vos images du jour puis cliquez sur « Create » Create.



Copie d'écran 52 : Nom Base de Données

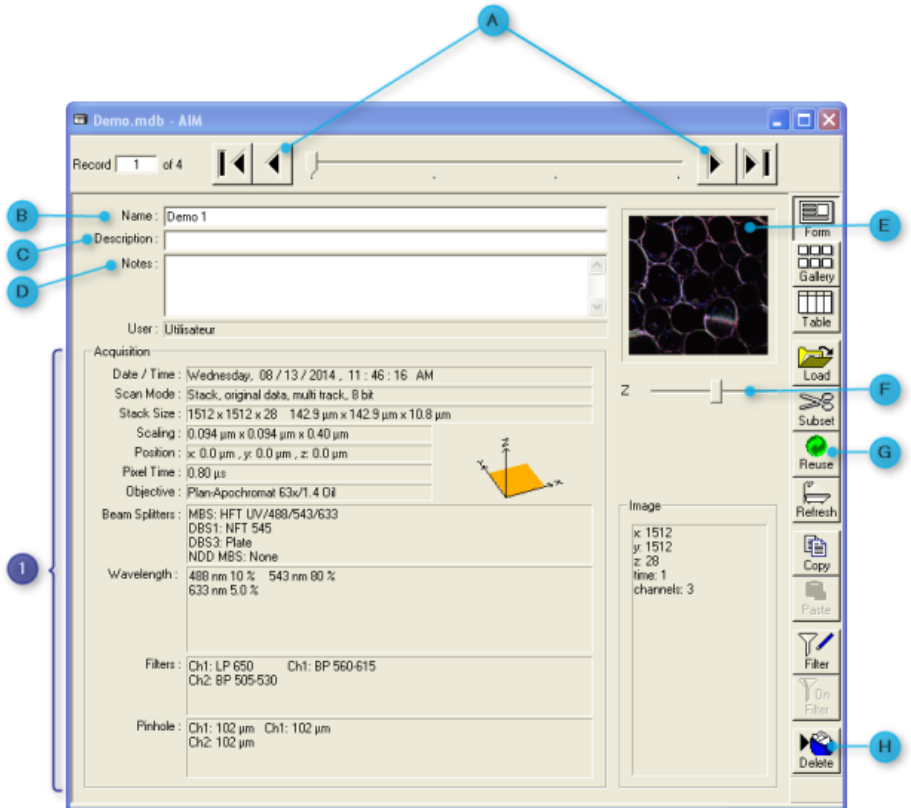
6. Le logiciel va ainsi automatiquement créer votre base de données avec le nom que vous lui avez donné. Vous retrouverez votre base de données dans votre dossier personnel et dans un sous-dossier automatiquement créé qui porte le nom de votre base de données.

Votre base de données est maintenant créée. Il est conseillé de créer une base de données par session.

Les bases de données sont des fichiers qui portent une extension **.mdb**.

A chaque fois que vous enregistrerez une image, les informations d'acquisition seront regroupées dans la base de données et un fichier image (avec l'extension **.lsm**) sera créé dans votre sous-dossier de base de données.

La création d'une base de données entraîne l'ouverture d'une fenêtre « Base de données ». Cette fenêtre affichera toutes les images que vous avez enregistrées dans la base. Cette fenêtre sera donc comme un catalogue de vos images que vous pourrez explorer pour visualiser un aperçu de vos images enregistrées ou les paramètres d'acquisition de chacune de vos images.



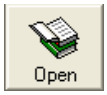
Copie d'écran 53 : Fenêtre « Base de données »

Légende :

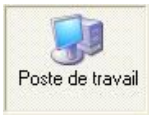
A- Sélection de l'image
B- Nom de l'image
C- Description de l'image
D- Notes sur l'image
E- Aperçu de l'image
F- Déplacement en z de l'image
G- Fonction « Reuse »
H- Suppression de l'image

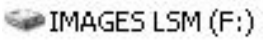
Pour ouvrir une ancienne base de données :

1. Cliquez sur l'icône « Files »

[*] dans la barre d'icônes principales puis sur « Open » 

[*].

2. Dans la fenêtre « Open Database » qui s'ouvre, cliquez sur « Poste de travail » 

puis double-cliquez sur le disque de stockage local dédié à l'enregistrement de vos fichiers 

(sur ce poste : F : Images LSM).

3. Le disque F : s'ouvre.

4. Double-cliquez sur votre dossier personnel puis sur le sous-dossier qui porte le nom de la base de données que vous souhaitez réouvrir (ex :

).

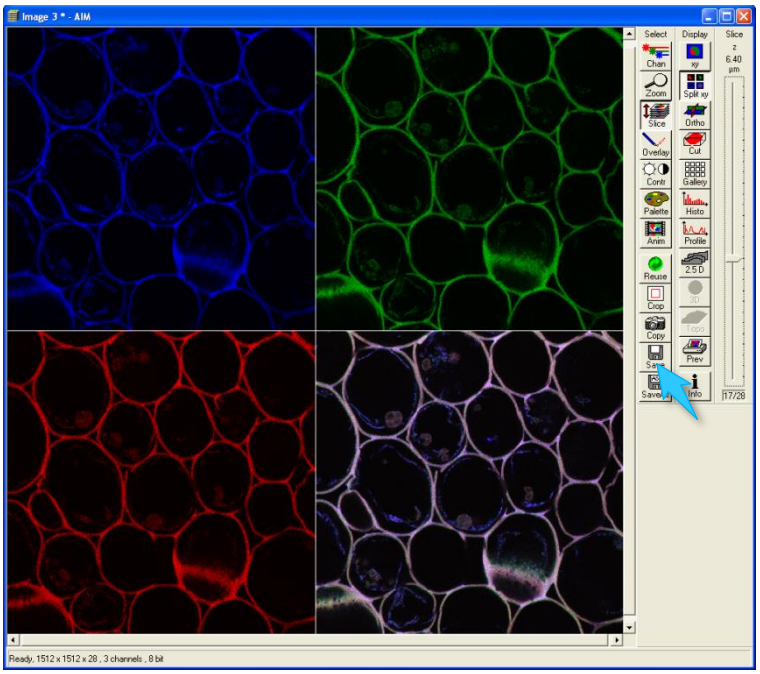
5. Double-cliquez sur le fichier base données .mdb présent dans le sous-dossier (ex :

).
6. La base de données s'ouvre.

Enregistrement de l'image

1. Une fois l'acquisition de l'image terminée, cliquez sur l'icône « Save »

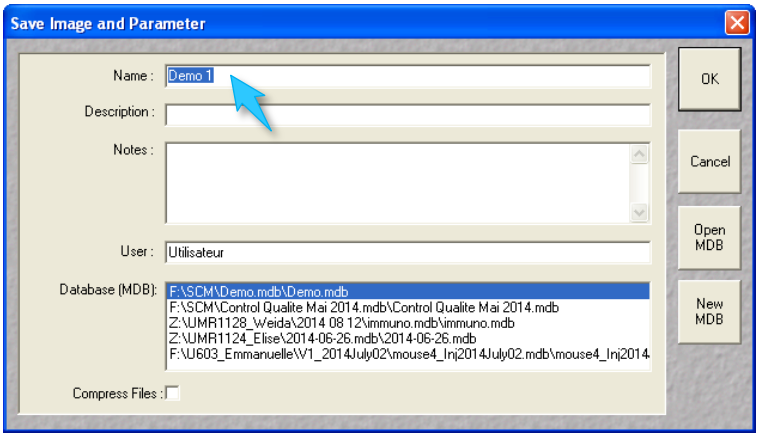
en bas à droite de la fenêtre image.



Copie d'écran 54 : Fenêtre Image - Sauvegarde

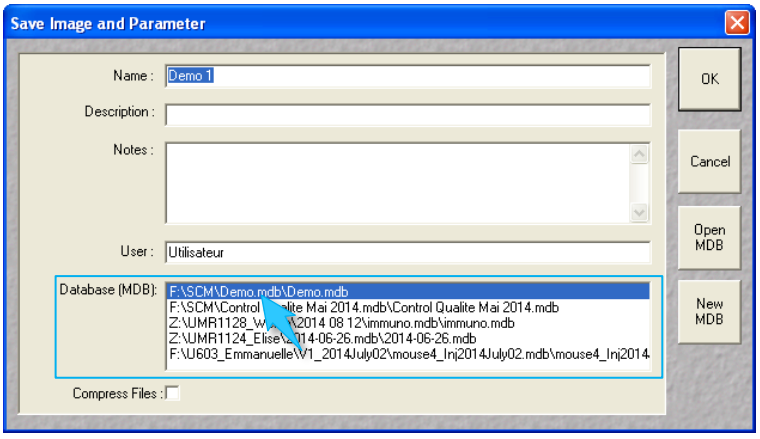
[*] *Présentation du software – p.3*

2. Dans la fenêtre « Save Image and Parameter » qui s'ouvre, mettez le nom que vous souhaitez dans le champ « Name ».



Copie d'écran 55 : Fenêtre « Save Image and Parameter »

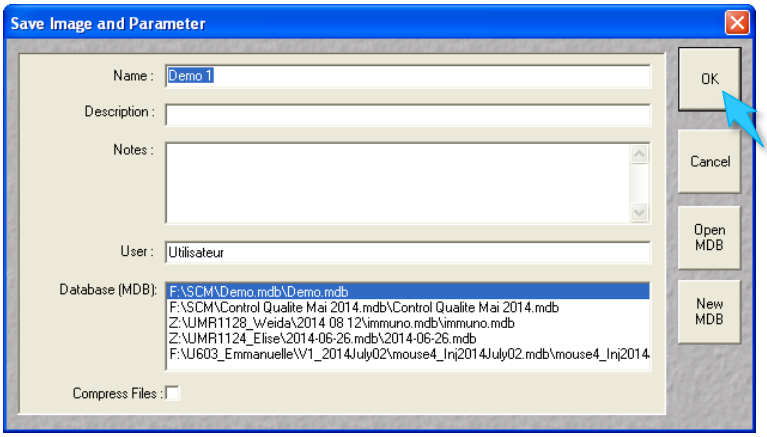
3. Toujours dans la fenêtre « Save Image and Parameter », vérifiez au niveau du champ « Database (MDB) », que vous enregistrez bien dans la bonne base de données. Si non, cliquez sur la base de votre choix.



Copie d'écran 56 : Fenêtre « Save Image and Parameter » - Champ Database (MDB)

Par défaut le logiciel se met sur la dernière base de données créée ou sur la dernière ouverte.

4. Enfin, dans la fenêtre « Save Image and Parameter », cliquez sur l'icône « Ok » pour finaliser l'enregistrement.



Copie d'écran 57 : Fenêtre « Save Image and Parameter » - 2

⊗ ***ATTENTION / A NE PAS FAIRE :***

N'ENREGISTREZ JAMAIS VOS IMAGES DIRECTEMENT SUR LE SERVEUR DE STOCKAGE « SCMRAID ». PENDANT LA SESSION, ENREGISTREZ TOUJOURS VOS IMAGES SUR LE DISQUE DUR LOCAL A L'ADRESSE INDIQUEE SUR L'ETIQUETTE JAUNE COLLEE SUR L'ECRAN DE L'ORDINATEUR.

L'acquisition et l'enregistrement des images sont maintenant terminés. Si vous avez le moindre doute ou si vous rencontrez une difficulté rapprochez-vous immédiatement du Responsable de la Plate-Forme.

Explorer ses images

Une fois vos images acquises et enregistrées vous pouvez les explorer.

Introduction

L'exploration des images se fait à partir de la fenêtre « Image ».

Pour ouvrir une fenêtre « Image » double-cliquez sur son aperçu dans la fenêtre « Base de données » *(voir Copie d'écran 53 : Fenêtre « Base de données – p.68)*.

Les icônes « Images »

Dans chaque fenêtre « Image » vous pouvez trouver sur la droite une série d'icônes qui vous permettra d'explorer de différentes façons votre image.

Icônes	Condition de présence	Fonction
	Sur toutes les images.	Superposition de tous les canaux (=merge).
	Sur les images multi-canaux.	Affiche séparément tous les canaux + merge .
	Sur les images Z-stack.	Affiche la vue orthogonale de l'image (Coupe en X, Y et Z).
	Sur les images Z-stack.	Permet d'afficher un plan de section du Z-stack.
	Sur les images multi-paramétriques (par exemple Z-satck).	Affiche séparément toutes les images qui composent l'expérience.
	Sur toutes les images.	Affiche l'histogramme (distribution de l'intensité des pixels) de l'image ou d'une région d'intérêt. Outil d'exploration de la colocalisation sur les images multi-canaux.

	Sur toutes les images.	Permet de réaliser des profils d'intensité.
	Sur toutes les images.	Affiche la distribution des intensités dans un pseudo mode 3D.
	Sur toutes les images.	Affiche les informations d'acquisition sur les images.
	Sur toutes les images.	Affiche les options des channels (couleurs, affichage/masquage).
	Sur toutes les images.	Affiche les options de zoom.
	Sur les images Z-stack.	Affiche le curseur de déplacement en Z.
	Sur toutes les images.	Affiche les options de dessin.
	Sur toutes les images.	Affiche les options de contraste.
	Sur toutes les images.	Affiche le panneau « Palette ».
	Sur toutes les images.	Recharge l'ensemble des paramètres d'acquisition de l'image.
	Sur toutes les images.	Active la fonction de crop.
	Sur toutes les images.	Permet de mettre l'image dans le presse papier.
	Sur toutes les images.	Ouvre la fenêtre de sauvegarde.

Changer d'objectif au cours de la session

Si vous souhaitez changer d'objectif pendant la session, suivez la procédure suivante :

Passage d'un objectif sec à un autre objectif sec

1. Vérifiez qu'aucune acquisition confocale n'est en cours (absence de barre de progression dans la zone d'activité – *voir Copie d'écran 40 : Fenêtre « Image » - p.56 – zone E*).
2. Cliquez sur l'icône « VIS »

(voir Présentation du software –p.3).
3. Sélectionnez votre objectif dans le logiciel *(voir Initiation pilotage/manipulation du microscope p.15)*.
4. L'objectif se met en place automatiquement.
5. Ajustez votre mise au point *(voir Réalisation de la mise au point – p.26)*.
6. Réajustez vos paramètres d'acquisitions en prenant en considération ce nouvel objectif *(voir Réglage des paramètres d'acquisition – p.47)*.
7. Faites vos nouvelles acquisitions *(voir Acquisition et enregistrement d'images – p.62)*.

Passage d'un objectif sec à un objectif à immersion

1. Vérifiez qu'aucune acquisition confocale n'est en cours (absence de barre de progression dans la zone d'activité – *voir Copie d'écran 40 : Fenêtre « Image » - p.56 – zone E*).
2. Cliquez sur l'icône « VIS »

(voir Présentation du software –p.3).
3. Descendez la tourelle d'objectif au maximum en utilisant une vis macrométrique (jusqu'à entre les bips) *(voir Initiation pilotage/manipulation du microscope p.15)*.
4. Basculez délicatement la tête du statif vers l'arrière *(voir Installation de l'échantillon – p.18 – Etape 6)*.
5. Retirez votre lame du porte-objet.
6. Sélectionnez votre objectif à immersion dans le logiciel *(voir Initiation pilotage/manipulation du microscope p.15)*.
7. L'objectif se met en place automatiquement.
8. Déposez une petite goutte d'huile sur la lentille de l'objectif *(voir Installation de l'échantillon – p.18 – Etape 11)*.

⊗ ***ATTENTION / A NE PAS FAIRE :***

Ne déposez pas trop d'huile sur l'objectif. Une petite goutte suffit. Si vous avez déposé trop d'huile, nettoyez immédiatement l'objectif avec du papier optique et redéposez une petite goutte d'huile.

9. Positionnez votre lame sur le porte-objet *(voir Installation de l'échantillon – p.18 – Etape 12)*.
10. Remettez délicatement la tête du statif en place *(voir Installation de l'échantillon – p.18 – Etape 17)*.
11. Allumez la lampe halogène et réglez l'intensité de façon à visualiser un spot de lumière *(voir Initiation pilotage/manipulation du microscope p.15)*.
12. Centrez votre échantillon dans le spot de lumière grâce au joystick x/y *(voir Initiation pilotage/manipulation du microscope p.15)*.

13. Montez à l'œil nu les objectifs avec une vis macrométrique jusqu'à ce que l'huile entre en contact avec la lamelle de votre échantillon. Recentrez au besoin votre échantillon dans le spot de lumière.

> ***Information complémentaire :***
>
> Utilisez la vis macrométrique pour approcher la lame de l'objectif. Tournez doucement la vis macrométrique vers le mur pour monter. L'huile est en contact avec l'objectif quand vous voyez l'huile s'étaler légèrement sur la lamelle.

14. Coupez la lampe halogène *(voir Initiation pilotage/manipulation du microscope p.15)*.
15. Ajustez votre mise au point *(voir Réalisation de la mise au point – p.26)*.
16. Réajustez vos paramètres d'acquisitions en prenant en considération ce nouvel objectif *(voir Réglage des paramètres d'acquisition – p.47)*.
17. Faites vos nouvelles acquisitions *(voir Acquisition et enregistrement d'images – p.62)*.

Passage d'un objectif à immersion à un objectif sec

1. Vérifiez qu'aucune acquisition confocale n'est en cours (absence de barre de progression dans la zone d'activité – *voir Copie d'écran 40 : Fenêtre « Image » - p.56 – zone E*).
2. Cliquez sur l'icône « VIS »

(voir Présentation du software –p.3).
3. Descendez la tourelle d'objectif au maximum en utilisant une vis macrométrique (jusqu'à entre les bips) *(voir Initiation pilotage/manipulation du microscope p.15)*.
4. Basculez délicatement la tête du statif vers l'arrière *(voir Installation de l'échantillon – p.18 – Etape 6)*.
5. Retirez votre lame du porte-objet.
6. Nettoyez soigneusement votre lame.
7. Nettoyez soigneusement l'objectif avec du papier optique.
8. Sélectionnez votre objectif sec dans le logiciel *(voir Initiation pilotage/manipulation du microscope p.15)*.
9. L'objectif se met en place automatiquement.
10. Positionnez votre lame sur le porte-objet *(voir Installation de l'échantillon – p.18 – Etape 12)*.
11. Remettez délicatement la tête du statif en place *(voir Installation de l'échantillon – p.18 – Etape 17)*.
12. Allumez la lampe halogène et réglez l'intensité de façon à visualiser un spot de lumière *(voir Initiation pilotage/manipulation du microscope p.15)*.
13. Centrez votre échantillon dans le spot de lumière grâce au joystick x/y *(voir Initiation pilotage/manipulation du microscope p.15)*.
14. Coupez la lumière transmise *voir Initiation pilotage/manipulation du microscope p.15)*.
15. Ajustez votre mise au point *(voir Réalisation de la mise au point – p.26)*.
16. Réajustez vos paramètres d'acquisitions en prenant en considération ce nouvel objectif *(voir Réglage des paramètres d'acquisition – p.47)*.
17. Faites vos nouvelles acquisitions *(voir Acquisition et enregistrement d'images – p.62)*.

Passage d'un objectif à immersion à un autre objectif à immersion

1. Vérifiez qu'aucune acquisition confocale n'est en cours (absence de barre de progression dans la zone d'activité – *voir Copie d'écran 40 : Fenêtre « Image » - p.56 – zone E*).
2. Cliquez sur l'icône « VIS »

(voir Présentation du software –p.3).
3. Descendez la tourelle d'objectif au maximum en utilisant une vis macrométrique (jusqu'à entre les bips) *(voir Initiation pilotage/manipulation du microscope p.15)*.
4. Basculez délicatement la tête du statif vers l'arrière *(voir Installation de l'échantillon – p.18 – Etape 6)*.
5. Retirez votre lame du porte-objet.
6. Nettoyez soigneusement l'objectif à immersion que vous venez d'utiliser avec du papier optique.
7. Sélectionnez votre autre objectif à immersion dans le logiciel *(voir Initiation pilotage/manipulation du microscope p.15)*.
8. L'objectif se met en place automatiquement.
9. Déposez une petite goutte d'huile sur la lentille de l'objectif *(voir Installation de l'échantillon – p.18 – Etape 11)*.

⊗ ***ATTENTION / A NE PAS FAIRE :***

Ne déposez pas trop d'huile sur l'objectif. Une petite goutte suffit. Si vous avez déposé trop d'huile, nettoyez immédiatement l'objectif avec du papier optique et redéposez une petite goutte d'huile.

10. Positionnez votre lame sur le porte-objet *(voir Installation de l'échantillon – p.18 – Etape 12)*.
11. Remettez délicatement la tête du statif en place *(voir Installation de l'échantillon – p.18 – Etape 17)*.
12. Allumez la lampe halogène et réglez l'intensité de façon à visualiser un spot de lumière *(voir Initiation pilotage/manipulation du microscope p.15)*.
13. Centrez votre échantillon dans le spot de lumière grâce au joystick x/y *(voir Initiation pilotage/manipulation du microscope p.15)*.
14. Montez à l'œil nu les objectifs avec une vis macrométrique jusqu'à ce que l'huile entre en contact avec la lamelle de votre échantillon. Recentrez au besoin votre échantillon dans le spot de lumière.

ⓘ ***Information complémentaire :***

Utilisez la vis macrométrique pour approcher la lame de l'objectif. Tournez doucement la vis macrométrique vers le mur pour monter. L'huile est en contact avec l'objectif quand vous voyez l'huile s'étaler légèrement sur la lamelle.

15. Coupez la lampe halogène *(voir Initiation pilotage/manipulation du microscope p.15)*.
16. Ajustez votre mise au point *(voir Réalisation de la mise au point – p.26)*.
17. Réajustez vos paramètres d'acquisitions en prenant en considération ce nouvel objectif *(voir Réglage des paramètres d'acquisition – p.47)*.
18. Faites vos nouvelles acquisitions *(voir Acquisition et enregistrement d'images – p.62)*.

Changer de lame au cours de la session

Si vous souhaitez changer de lame au cours de la session suivez la procédure suivante :

Si vous êtes sur un objectif sec

1. Vérifiez qu'aucune acquisition confocale n'est en cours (absence de barre de progression dans la zone d'activité – *voir Copie d'écran 40 : Fenêtre « Image » - p.56 – zone E*).
2. Cliquez sur l'icône « VIS »

(voir Présentation du software –p.3).
3. Descendez la tourelle d'objectif au maximum en utilisant une vis macrométrique (jusqu'à entre les bips) *(voir Initiation pilotage/manipulation du microscope p.15)*.
4. Basculez délicatement la tête du statif vers l'arrière *(voir Installation de l'échantillon – p.18 – Etape 6)*.
5. Retirez votre lame du porte-objet.
6. Mettez en place votre nouvelle lame sur le porte objet *(voir Installation de l'échantillon – p.18 – Etape 10)*.
7. Remettez délicatement la tête du statif en place *(voir Installation de l'échantillon – p.18 – Etape 17)*.
8. Allumez la lampe halogène et réglez l'intensité de façon à visualiser un spot de lumière *(voir Initiation pilotage/manipulation du microscope p.15)*.
9. Centrez votre échantillon dans le spot de lumière grâce au joystick x/y *(voir Initiation pilotage/manipulation du microscope p.15)*.
10. Coupez la lumière transmise *voir Initiation pilotage/manipulation du microscope p.15)*.
11. Ajustez votre mise au point *(voir Réalisation de la mise au point – p.26)*.
12. Réajustez vos paramètres d'acquisitions si besoin *(voir Réglage des paramètres d'acquisition – p.47)*.
13. Faites vos nouvelles acquisitions *(voir Acquisition et enregistrement d'images – p.62)*.

Si vous êtes sur un objectif à immersion

1. Vérifiez qu'aucune acquisition confocale n'est en cours (absence de barre de progression dans la zone d'activité – *voir Copie d'écran 40 : Fenêtre « Image » - p.56 – zone E*).
2. Cliquez sur l'icône « VIS »

(voir Présentation du software –p.3).
3. Descendez la tourelle d'objectif au maximum en utilisant une vis macrométrique (jusqu'à entre les bips) *(voir Initiation pilotage/manipulation du microscope p.15)*.
4. Basculez délicatement la tête du statif vers l'arrière *(voir Installation de l'échantillon – p.18 – Etape 6)*.
5. Retirez votre lame du porte-objet.
6. Nettoyez soigneusement l'objectif à immersion que vous venez d'utiliser avec du papier optique.
7. Déposez une nouvelle petite goutte d'huile sur la lentille de l'objectif *(voir Installation de l'échantillon – p.18 – Etape 11)*.

⊗ ***ATTENTION / A NE PAS FAIRE :***

Ne déposez pas trop d'huile sur l'objectif. Une petite goutte suffit. Si vous avez déposé trop d'huile, nettoyez immédiatement l'objectif avec du papier optique et redéposez une petite goutte d'huile.

8. Positionnez votre lame sur le porte-objet *(voir Installation de l'échantillon – p.18 – Etape 12)*.
9. Remettez délicatement la tête du statif en place *(voir Installation de l'échantillon – p.18 – Etape 17)*.
10. Allumez la lampe halogène et réglez l'intensité de façon à visualiser un spot de lumière *(voir Initiation pilotage/manipulation du microscope p.15)*.
11. Centrez votre échantillon dans le spot de lumière grâce au joystick x/y *(voir Initiation pilotage/manipulation du microscope p.15)*.
12. Montez à l'œil nu les objectifs avec une vis macrométrique jusqu'à ce que l'huile entre en contact avec la lamelle de votre échantillon. Recentrez au besoin votre échantillon dans le spot de lumière.

ⓘ ***Information complémentaire :***

Utilisez la vis macrométrique pour approcher la lame de l'objectif. Tournez doucement la vis macrométrique vers le mur pour monter. L'huile est en contact avec l'objectif quand vous voyez l'huile s'étaler légèrement sur la lamelle.

13. Coupez la lampe halogène *(voir Initiation pilotage/manipulation du microscope p.15)*.
14. Ajustez votre mise au point *(voir Réalisation de la mise au point – p.26)*.
15. Réajustez vos paramètres d'acquisitions si besoin *(voir Réglage des paramètres d'acquisition – p.47)*.
16. Faites vos nouvelles acquisitions *(voir Acquisition et enregistrement d'images – p.62)*.

Rappel des paramètres d'acquisition d'une image

Nous avons déjà vu au chapitre « Enregistrement et rappel de configuration » *p.45* comment rappeler une configuration de trajet optique confocal. Cette technique permet de remettre en place rapidement le trajet optique enregistré pour de futures acquisitions.

Si vous souhaitez comparer des images que vous avez acquises à la session 1 avec des images que vous allez faire à la session 2 vous devez non seulement recharger la configuration du trajet optique confocal mais aussi l'intégralité des autres réglages que vous aviez effectués (Résolution, Dynamique, % de transmission des lasers, Taille des pinholes, Gain, Offset…). Si un des réglages varie d'une session à l'autre il n'est plus possible de comparer de façon quantitative les images.

Pour vous remettre dans les mêmes conditions d'acquisitions (même trajet optique et mêmes réglages) qu'une image de référence suivez la procédure suivante :

1. Ouvrez la base de données contenant votre image de référence à partir du disque dur local (F:/) *(voir Création et ouverture d'une base de données – p.66)*.
2. Cherchez et affichez votre image de référence dans la base de données. Vous devez voir votre image de référence dans la zone d'aperçu de la base de données *(voir Copie d'écran 53 : Fenêtre « Base de données » - p.68 - Zone E)*.
3. Cliquez sur l'icône « Reuse »

(voir Copie d'écran 53 : Fenêtre « Base de données » - p.68 - Zone G).

   Cette option recharge alors le trajet optique confocal (avec l'objectif) et tous les paramètres qui ont été utilisés pour acquérir l'image de référence.

⊗ ***ATTENTION / A NE PAS FAIRE :***

Si vous êtes avec un objectif à immersion et que vous souhaitez recharger des paramètres d'acquisition réalisés avec un objectif sec, NETTOYEZ D'ABORD VOTRE LAMELLE AVANT DE RECHARGER LES PARAMETRES AVEC LA FONCTION REUSE (Voir « Passage d'un objectif à immersion à un objectif sec » – p.75).

Fin de session

Veillez à respecter vos horaires de sessions. Pensez à garder du temps en fin de session pour réaliser les étapes de récupération des échantillons, nettoyage et arrêt de l'équipement si besoin.

Etapes initiales

Lorsque vous avez terminé vos acquisitions, suivez la procédure suivante :

1. Vérifiez que toutes les images que vous souhaitez conserver sont bien enregistrées.
2. Fermez toutes les images ouvertes dans le logiciel.
3. Fermez toutes les fenêtres **SAUF** la fenêtre principale du logiciel *(voir Copie d'écran 1 : Fenêtre principale du logiciel – p.3)*.

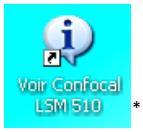
4. Transférez vos images sur le serveur de stockage SCMRAID :
   a. Rejoignez votre dossier personnel local (disque F:/). Pour rejoindre le lieu de stockage local vous pouvez aussi double-cliquer sur l'icône « Stockage Local »

*.

   b. Copiez votre sous-dossier pour l'expérience du jour.

   c. Ouvrez le serveur de stockage SCMRAID en double-cliquant sur l'icône « SCMRAID »

*.
   d. Rejoignez votre dossier personnel serveur.
   e. Coller votre dossier expérience du jour.

5. Fermez les fenêtres du dossier local et serveur.
6. Vérifiez le planning de réservation en double-cliquant sur l'icône « Planning » située sur le bureau 

*.

   Le planning de la semaine en cours s'ouvre.

* *Voir Bureau de l'ordinateur*

semaine **25**	lundi **16 juin**	mardi **17 juin**	mercredi **18 juin**	jeudi **19 juin**	vendredi **20 juin**	samedi **21 juin**	dimanche **22 juin**
09:00 - 10:00	vous	un autre utilisateur	vous	vous	un autre utilisateur	-	-
10:00 - 11:00	vous	un autre utilisateur	vous	vous	un autre utilisateur	-	-
11:00 - 12:00	vous	un autre utilisateur	vous	-	un autre utilisateur	-	-
12:00 - 13:00	-	un autre utilisateur	-	-	un autre utilisateur	-	-
13:00 - 14:00	un autre utilisateur	vous	-	-	un autre utilisateur	-	-
14:00 - 15:00	un autre utilisateur	vous	-	-	un autre utilisateur	-	-
15:00 - 16:00	un autre utilisateur	un autre utilisateur	un autre utilisateur	un autre utilisateur	un autre utilisateur	-	-
16:00 - 17:00	un autre utilisateur	un autre utilisateur	un autre utilisateur	un autre utilisateur	vous	-	-
17:00 - 18:00	-	un autre utilisateur	-	-	vous	-	-
18:00 - 19:00	-	-	-	-	-	-	-
19:00 - 20:00	-	-	-	-	-	-	-
20:00 - 21:00	-	-	-	-	-	-	-

Copie d'écran 58 : Planning de réservation

S'il y a un utilisateur juste après vous (exemple le 17 juin ci-dessus) ou s'il y a 1, 2 ou 3 heures de libre entre vous et le suivant (exemple le 16 et 18 juin ci-dessus) suivez la **procédure de fin n°1**.

S'il y a plus de 3 heures de libre entre vous et les suivants (exemple le 19 juin ci-dessus) ou si vous êtes le dernier utilisateur de la journée (exemple le 20 juin) suivez la **procédure de fin n°2**.

Procédure de Fin n°1 – Sans arrêt de l'équipement

Cette procédure est à suivre uniquement si :

- Il y a un utilisateur juste après vous.
- Il y a un utilisateur 1, 2 ou 3 heures après vous.

Après avoir correctement suivi les étapes initiales de fin de session *(voir Etapes initiales – p.80)* suivez la procédure suivante :

1. Récupérez votre échantillon :
    a. Cliquez sur l'icône « VIS »

(voir Présentation du software –p.3).
    b. Descendez la tourelle d'objectif au maximum en utilisant une vis macrométrique (jusqu'à entre les bips) *(voir Initiation pilotage/manipulation du microscope p.15)*.
    c. Basculez délicatement la tête du statif vers l'arrière *(voir Installation de l'échantillon – p.18 – Etape 6)*.
    d. Retirez votre lame du porte-objet.
    e. Nettoyez soigneusement votre lame.

2. Si vous étiez sur un objectif à immersion, nettoyez soigneusement l'objectif (sinon passez directement à l'étape 3) :
    a. Prenez un papier optique et plier le en 4.
    b. Essuyez délicatement l'objectif (n'appuyez pas fort).
    c. Repliez votre papier optique.
    d. Ressuyez une nouvelle fois l'objectif délicatement.
    e. Répétez les étapes ci-dessus (a à d) pour les autres objectifs à immersion que vous auriez utilisés.

3. Remettez délicatement la tête du statif en place *(voir Installation de l'échantillon – p.18 – Etape 17)*.
4. Remettez en place l'écran de protection pour la fluorescence *(voir Réalisation de la mise au point – p.26 – Etape 1)*.

5. Nettoyez si besoin la platine avec un Kimtech imprégné d'alcool.
6. Nettoyez si besoin le bureau avec un Kimtech imprégné d'alcool.

7. Récupérez vos affaires personnelles.

8. Fermez bien la porte à clé en quittant le Service.

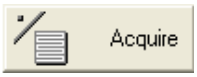
Votre session est maintenant terminée. Si vous avez le moindre doute ou si vous rencontrez une difficulté rapprochez-vous immédiatement du Responsable de la Plate-Forme.

Procédure de Fin n°2 – Arrêt complet de l'équipement

Cette procédure est à suivre uniquement si :

- Il y a plus de 3 heures de libre entre vous et l'utilisateur suivant.
- Vous êtes le dernier utilisateur de la journée.

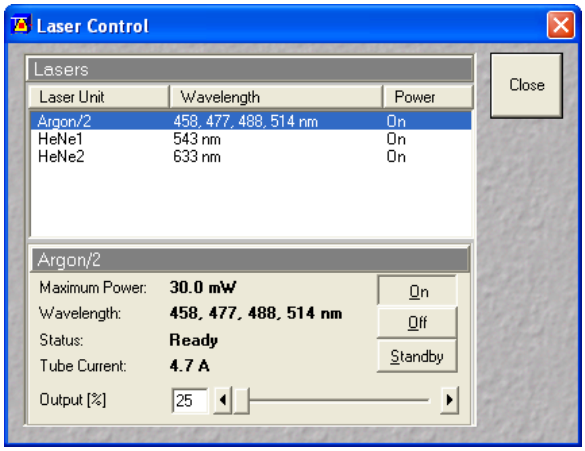
Après avoir correctement suivi les étapes initiales de fin de session *(voir Etapes initiales – p.80)* suivez la procédure suivante.

1. Dans la fenêtre principale du logiciel, cliquez sur l'icône principale « Acquire »* 

puis sur l'icône secondaire « Laser »*

pour ouvrir le panneau « Laser Control».

2. La fenêtre « Laser Control » s'ouvre, vous montrant les différents lasers.

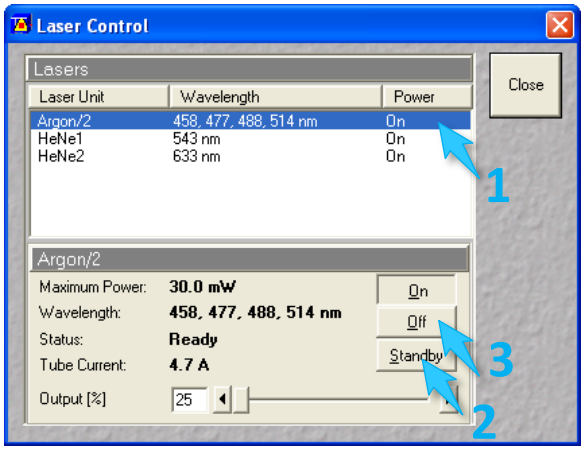


Copie d'écran 59 : Fenêtre « Laser Control » - 2

3. Si vous l'avez allumez, cliquez sur le laser Argon/2 pour le mettre en surbrillance puis cliquez sur l'icône « Stanby »

puis « Off »

.

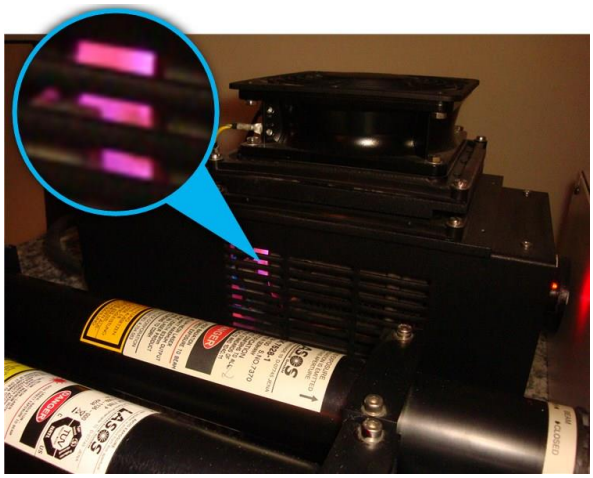


Copie d'écran 60 : Fenêtre « Laser Control » - 3

* *Voir Présentation du software – p.3*

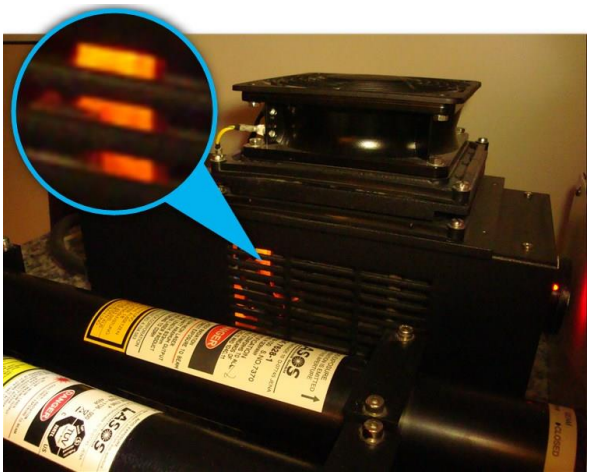
Ceci va avoir pour conséquence de mettre le laser Argon/2 en refroidissement. Cette étape est indispensable pour un arrêt correct de ce laser.

Il faut compter environ 5 minutes pour que le laser Argon/2 refroidisse.



Copie d'écran 61 : Couleur rose = Laser en marche

>



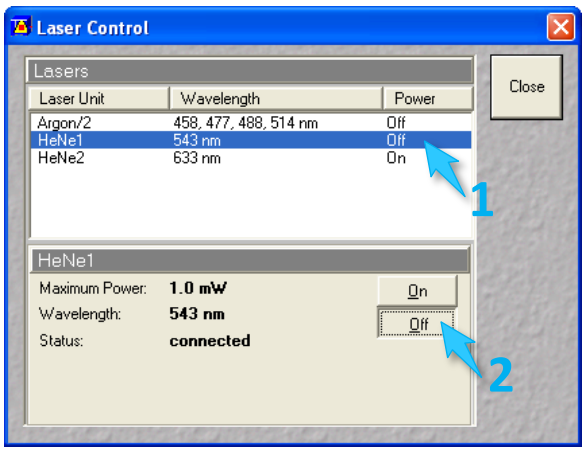
Copie d'écran 62 : Couleur Jaune = Laser en refroidissement

Copie d'écran 63 : Sans couleur = Le Laser a terminé son refroidissement

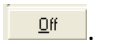
Pendant le temps du refroidissement du laser Argon/2 continuez la procédure (voir ci-dessous) :

4. Dans la fenêtre « Laser Control », cliquez sur le laser HeNe1 (si vous l'avez utilisé) pour le mettre en surbrillance puis cliquez sur l'icône « Off »

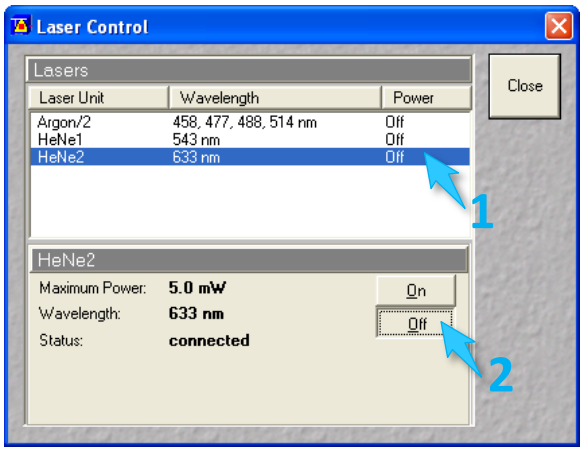
.



Copie d'écran 64 : Fenêtre « Laser Control » - 4

5. Dans la fenêtre « Laser Control », cliquez sur le laser HeNe2 (si vous l'avez utilisé) pour le mettre en surbrillance puis cliquez sur l'icône « Off » 

.

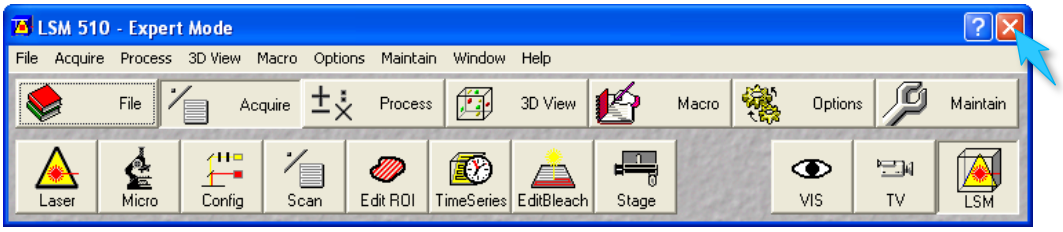


Copie d'écran 65 : Fenêtre « Laser Control » - 4

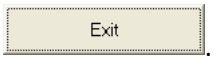
6. Fermez la fenêtre « Laser Control » en cliquant sur l'icône « Close »

.

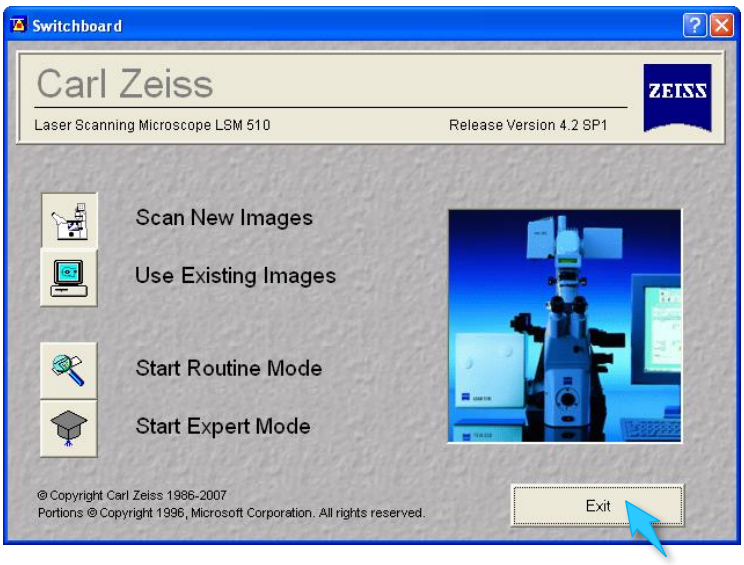
7. Fermez la fenêtre principale du logiciel en cliquant sur la croix rouge en haut à droite.



Copie d'écran 66 : Fenêtre principale du logiciel - 2

8. Sur la fenêtre « Switchboard » qui s'ouvre, cliquez sur l'icône « Exit » 

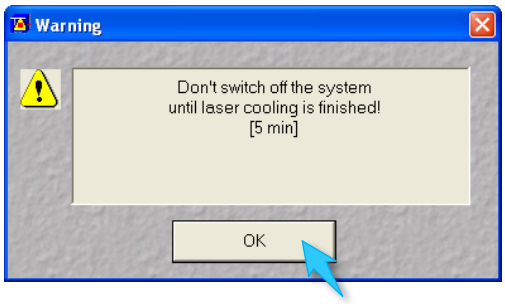
.



Copie d'écran 67 : Panneau « Switchboard » - 2

9. Le message d'avertissement concernant le refroidissement du laser Argon/2 s'affiche. Il vous rappelle de ne **SURTOUT PAS** couper le système avant que le refroidissement du laser soit terminé (lumière jaune du laser éteinte *– voir Copie d'écran 63 : Sans couleur = Le Laser a terminé son refroidissement – p.84*).

Fermez cette fenêtre en cliquant sur « OK ».



Copie d'écran 68 : Fenêtre « Warning »

10. Après avoir vérifié que votre transfert d'images était bien terminé, cliquez sur « démarrer »

(en bas à gauche de l'écran) puis sur « Arrêter »

.

11. Récupérez votre échantillon :

a. Descendez la tourelle d'objectif au maximum en utilisant une vis macrométrique (jusqu'à entre les bips) *(voir Initiation pilotage/manipulation du microscope p.15)*.
b. Basculez délicatement la tête du statif vers l'arrière *(voir Installation de l'échantillon – p.18 – Etape 6)*.
c. Retirez votre lame du porte-objet.
d. Nettoyez soigneusement votre lame.

12. Si vous étiez sur un objectif à immersion, nettoyez soigneusement l'objectif (sinon passez directement à l'étape 13) :

a. Prenez un papier optique et pliez-le en 4.
b. Essuyez délicatement l'objectif (n'appuyez pas fort).
c. Repliez votre papier optique.

d. Ressuyez une nouvelle fois l'objectif délicatement.
e. Prenez un nouveau papier optique et pliez-le en 4. Imprégnez-le d'alcool à 50° puis essuyez une nouvelle fois délicatement l'objectif avec ce papier.
f. Prenez un dernier papier optique et pliez-le en 4.
g. Essuyez délicatement l'objectif.
h. Répétez les étapes ci-dessus (a à g) pour les autres objectifs à immersion que vous auriez utilisés.

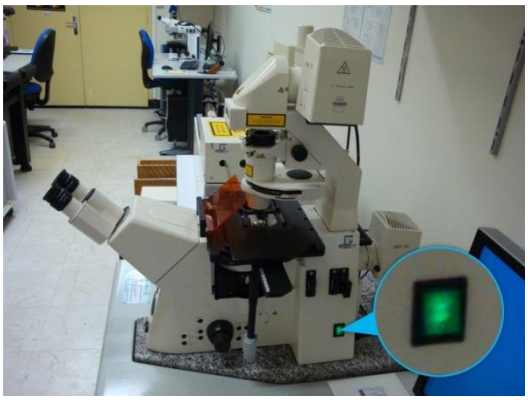
13. Remettez délicatement la tête du statif en place *(voir Installation de l'échantillon – p.18 – Etape 17)*.
14. Remettez en place l'écran de protection pour la fluorescence *(voir Réalisation de la mise au point – p.26 – Etape 1)*.

15. Nettoyez si besoin la platine avec un Kimtech imprégné d'alcool.
16. Nettoyez si besoin le bureau avec un Kimtech imprégné d'alcool.

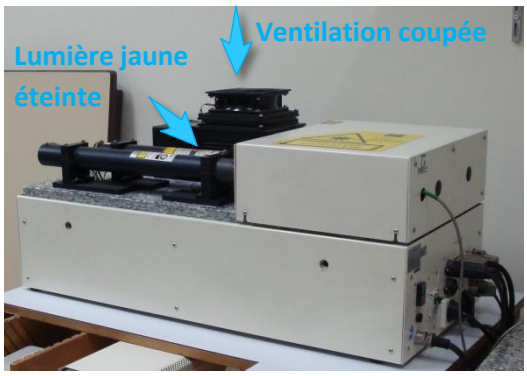
17. Coupez la lampe HBO (Lampe Fluo).

Photo(s) 22 : Arrêt lampe HBO

18. **<u>Ne coupez pas le statif</u>**


Photo(s) 23 : Ne coupez pas le statif

19. Assurez-vous que le refroidissement du laser Argon est bien terminé (lumière jaune du laser est éteinte *– voir Copie d'écran 63 : Sans couleur = Le Laser a terminé son refroidissement – p.84* et vous ne sentez plus d'air sortir du ventilateur du laser).



Photo(s) 24 : Vérification arrêt laser

ATTENTION

Avant de réaliser l'étape 18 ci-dessous, assurez-vous que le laser Argon/2 a bien terminé son refroidissement. Il y a 3 indicateurs de refroidissement terminé :

- Le bruit de la ventilation s'arrête.
- La lumière jaune de refroidissement s'éteint.
- On ne sent plus de courant d'air au niveau du ventilateur du laser Argon.

Tant que le refroidissement n'est pas terminé ne réalisez **SURTOUT PAS** l'étape 18 ci-dessous.

ATTENDEZ IMPERATIVEMENT LA FIN DU REFROIDISSEMENT.

20. **Après-vous être assuré que le refroidissement du laser Argon est bien terminé** (voir étape précédente), mettez le « Remote Control » sur OFF.

Photo(s) 25 : Arrêt « Remote Control »

21. Remettez la housse de protection du banc lasers en prenant soin de ne pas toucher la fibre optique.

Photo(s) 26 : Housse banc lasers

22. Remettez la house de protection du statif.

Photo(s) 27 : Housse statif

Veillez à ne pas recouvrir la lampe HBO avec la housse (la fente à l'arrière de la housse est prévue à cet effet).

Photo(s) 28 : Etat du microscope en fin de session avec procédure d'arrêt n°2 – Arrêt complet du microscope

23. Récupérez vos affaires personnelles.

24. Coupez la lampe de bureau.

25. Fermez bien la porte à clé en quittant le Service.

Votre session est maintenant terminée. Si vous avez le moindre doute ou si vous rencontrez une difficulté rapprochez-vous immédiatement du Responsable de la Plate-Forme.

Procédures en cas d'incident

EN CAS D'URGENCE TECHNIQUE OU D'INCIDENT SUR UN EQUIPEMENT, RAPROCCHEZ VOUS IMMEDIATEMENT DU RESPONSABLE DE LA PLATE-FORME. EN CAS D'ABSENCE DU RESPONSABLE DE LA PLATE-FORME SUIVEZ LES PROCEDURES CI-DESSOUS.

Procédure Urgence Technique – En cas d'absence du Responsable de la Plate-Forme

ATTENTION

Cette procédure concerne uniquement les problèmes relatifs aux locaux du SCM. Ne concerne pas les incidents relatifs aux microscopes.

En cas de problème dans une pièce

Si vous constatez une anomalie dans une pièce du SCM (fuite d'eau, coupure d'électricité…) contactez immédiatement l'atelier (Service Technique) du site et décrivez le problème.

En cas de besoin, insistez sur le caractère urgent d'une intervention ; si par exemple de l'eau menace de tomber sur un microscope.

A contacter en priorité :

Responsable Atelier - José LUIT
Tél. : 01 42 86 20 19 Port. 06 63 13 35 99

Si pas de réponse vous pouvez essayer de contacter :

Accueil Service Technique
Tél. : 01 42 86 20 16

Si vous entendez ou voyez de l'eau couler du plafond

Si l'eau menace de tomber sur un microscope :

1- Coupez immédiatement le microscope en respectant bien la procédure d'arrêt.
2- Protégez le microscope avec les bâches que vous trouverez dans le meuble à clapets gris foncé situé en face du microscope confocal Zeiss LSM 510 (casier du bas noté : BACHES DE PROTECTION).
   3 tailles de bâches sont disponibles : Small, Medium et Large.
3- Contactez le plus rapidement possible le Responsable de l'Atelier (voir fiche de contact ci-dessus).
4- Envoyez un e-mail à l'adresse suivante : scm@parisdescartes.fr pour signaler l'incident.

Procédure en cas d'incident Equipement

En cas d'absence du Responsable de la Plate-Forme :

Si vous rencontrez un problème lors de l'utilisation d'un équipement et que le Responsable de la Plate-Forme n'est pas disponible, vous pouvez contacter :

- M. TOURAIN Christophe
  N° de Poste : 01 42 86 21 08
  E-Mail : christophe.tourain@parisdescartes.fr

  Localisation : 3ème étage – Pièce P326

N'oubliez pas d'envoyer un e-mail à l'adresse suivante : scm@parisdescartes.fr pour notifier l'incident.

Si vous ne trouvez personne pour résoudre le problème :

Si personne ne peut vous aider, merci de remplir le formulaire « Incident Microscope » disponible sur le site du SCM à l'adresse suivante :

http://www.biomedicale.univ-paris5.fr/scm/formulaire_incident_equipement

Vous pouvez accéder directement à ce formulaire en double cliquant sur le lien présent sur chaque bureau d'ordinateur de la Plate-Forme.

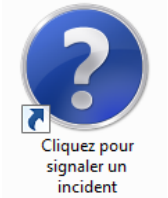


Table des illustrations

Copies d'écran

Copie d'écran 1 : Fenêtre principale du logiciel 3
Copie d'écran 2 : Fenêtre « Laser Control » 4
Copie d'écran 3 : Fenêtre « Microscope Control » 5
Copie d'écran 4 : Fenêtre « Configuration control » 5
Copie d'écran 5 : Fenêtre « Scan control » 6
Copie d'écran 6 : Fenêtre « Projection » 7
Copie d'écran 7 : Organisation espace de travail 8
Copie d'écran 8 : Fenêtre d'ouverture du logiciel LSM 510 13
Copie d'écran 9 : Panneau « Switchboard » - Démarrage du logiciel LSM 510 13
Copie d'écran 10 : Fenêtre d'initialisation du logiciel 14
Copie d'écran 11 : Fenêtre "Microscope Control" 2 15
Copie d'écran 12 : Liste Objectifs 18
Copie d'écran 13 : Fenêtre SpectraViewer 28
Copie d'écran 14 : Spectres des fluorochromes 29
Copie d'écran 15 : Fenêtre « Laser Control » 31
Copie d'écran 16 : Fenêtre « Configuration Control » - Détails 33
Copie d'écran 17 : Fenêtre « Configuration Control » - Choix du mode 34
Copie d'écran 18 : Spectres des fluorochromes de la lame de démo 34
Copie d'écran 19 : Nom des tracks 35
Copie d'écran 20 : Option Excitation – Fenêtre « Configuration Control » 35
Copie d'écran 21 : Réglage pourcentage de transmission lasers - 1 36
Copie d'écran 22 : Choix du miroir dichroïque principal - 1 36
Copie d'écran 23 : Sélection fausse couleur - 1 39
Copie d'écran 24 : Option Excitation – Fenêtre « Configuration Control » - 2 40
Copie d'écran 25 : Réglage pourcentage de transmission lasers - 2 40
Copie d'écran 26 : Choix du miroir dichroïque principal - 2 41
Copie d'écran 27 : Sélection fausse couleur - 2 43
Copie d'écran 28 : Photomultiplicateur en transmission 44
Copie d'écran 29 : Sauvegarde configuration - 1 45
Copie d'écran 30 : Sauvegarde configuration - 2 45
Copie d'écran 31 : Rappel de configuration - 1 45
Copie d'écran 32 : Choix d'une configuration enregistrée 46
Copie d'écran 33 : Fenêtre « Scan Control » - Détails 48
Copie d'écran 34 : Vérification objectif - Panneau « Scan Control » / Sous-fenêtre « Mode » 49
Copie d'écran 35 : Zone « Speed » - Panneau « Scan Control » 50
Copie d'écran 36 : Zone Zoom – Fenêtre « Scan Control » - Sous fenêtre « Mode » 52
Copie d'écran 37 : Sélection Track – Sous fenêtre "Channels" 53
Copie d'écran 38 : Sélection 1AU - Panneau "Channels" 53
Copie d'écran 39 : Panneau « Optical Slice » 54

Copie d'écran 40 : Fenêtre « Image » 56
Copie d'écran 41 : Fenêtre « Image » - Image Splitée 57
Copie d'écran 42 : Panneau « Color Palette » 58
Copie d'écran 43 : Range Indicator 58
Copie d'écran 44 : Recherche du Z le plus intense 59
Copie d'écran 45 : Réglage « Detector Gain » 59
Copie d'écran 46 : Ajustement "Digital Offset" 60
Copie d'écran 47 : Image simple acquise 63
Copie d'écran 48 : Barre de progression (1) 63
Copie d'écran 49 : Barre de progression - Z-Stack 65
Copie d'écran 50 : Fenêtre « Create New Database » 66
Copie d'écran 51 : Contenu du disque de stockage local 67
Copie d'écran 52 : Nom Base de Données 67
Copie d'écran 53 : Fenêtre « Base de données » 68
Copie d'écran 54 : Fenêtre Image - Sauvegarde 69
Copie d'écran 55 : Fenêtre « Save Image and Parameter » 70
Copie d'écran 56 : Fenêtre « Save Image and Parameter » - Champ Database (MDB) 70
Copie d'écran 57 : Fenêtre « Save Image and Parameter » - 2 70
Copie d'écran 58 : Planning de réservation 81
Copie d'écran 59 : Fenêtre « Laser Control » - 2 83
Copie d'écran 60 : Fenêtre « Laser Control » - 3 83
Copie d'écran 61 : Couleur rose = Laser en marche 84
Copie d'écran 62 : Couleur Jaune = Laser en refroidissement 84
Copie d'écran 63 : Sans couleur = Le Laser a terminé son refroidissement 84
Copie d'écran 64 : Fenêtre « Laser Control » - 4 85
Copie d'écran 65 : Fenêtre « Laser Control » - 4 85
Copie d'écran 66 : Fenêtre principale du logiciel - 2 85
Copie d'écran 67 : Panneau « Switchboard » - 2 86
Copie d'écran 68 : Fenêtre « Warning » 86

Photos

Photo(s) 1 : Vue d'ensemble du microscope confocal Zeiss LSM 510 1
Photo(s) 2 : Etape de démarrage du microscope 9
Photo(s) 3 : Remote Control 9
Photo(s) 4 : Alimentation lampe HBO 9
Photo(s) 5 : Alimentation statif 10
Photo(s) 6 : Vues statif 16
Photo(s) 7 : Joystick 17
Photo(s) 8 : Variateur lumière 18
Photo(s) 9 : Bascule de la tête du statif 19
Photo(s) 10 : Retrait écran de protection 20
Photo(s) 11 : Centrage platine 20
Photo(s) 12 : Vérification porte-objet 20
Photo(s) 13 : Vérification de la platine 21

Photo(s) 14 : Mise en place du porte-objet 21
Photo(s) 15 : Dépôt milieu d'immersion 23
Photo(s) 16 : Mise en place de la lame 23
Photo(s) 17 : Approche de l'objectif 24
Photo(s) 18 : Bascule de la tête du statif 25
Photo(s) 19 : Ecran de protection 26
Photo(s) 20 : Mise au point 26
Photo(s) 21 : Réticule de visée 26
Photo(s) 22 : Arrêt lampe HBO 87
Photo(s) 23 : Ne coupez pas le statif 87
Photo(s) 24 : Vérification arrêt laser 87
Photo(s) 25 : Arrêt « Remote Control » 88
Photo(s) 26 : Housse banc lasers 88
Photo(s) 27 : Housse statif 89
Photo(s) 28 : Etat du microscope en fin de session avec procédure d'arrêt n°2 – Arrêt complet du microscope 89

Schémas

Schéma 1 : Trajet Optique en mode confocal 30
Schéma 2 : Séparation des émissions – Miroirs Dichroïques secondaire NFT 37
Schéma 3 : Séparation des émissions – Miroirs Dichroïques secondaire NFT 42
Schéma 4 : Figure de diffraction d'un point 53

Tableaux

Tableau 1 : Icônes principales et secondaires 3
Tableau 2 : Tableau d'expérience rempli 32

Pour toute remarque ou suggestion concernant ce guide merci d'envoyer un e-mail à l'adresse suivante :

scm@parisdescartes.fr